Beatriz Maia Souza

Retomada do ciclo celular induzida por variações dos teores endógenos de hormônios, açúcares e aminoácidos em primórdio de gema axilar de *Ananas comosus* (L.) Merr.

> São Paulo 2006

Livros Grátis

http://www.livrosgratis.com.br

Milhares de livros grátis para download.

Beatriz Maia Souza

Retomada do ciclo celular induzida por variações dos teores endógenos de hormônios, açúcares e aminoácidos em primórdio de gema axilar de *Ananas comosus* (L.) Merr.

Tese apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, para a obtenção de Título de Doutor em Ciências, na Área de Botânica.

Orientação: Profa. Dra. Helenice Mercier

São Paulo 2006

Ficha Catalográfica

S 729r	Souza, Beatriz Maia Retomada do ciclo celular induzida por variações los teores endógenos de hormônios, açúcares e aminoácidos em primórdio de gema axilar de Ananas comosus L. (Merr.) / Beatriz Maia Souza São Paulo: B. M. S., 2006. 31 p.	
Te da De	ese (Doutorado) - Instituto de Biociências Universidade de São Paulo. partamento de Botânica, 2006.	
 Divisão celular. 2. Hormônios. 3. Açúcares. Aminoácidos. 5. Primórdio de gema axilar. I.Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de Botânica. II. Título. 		
	LC QK 711.2	
	OK 725	

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a). Orientador(a)

Aos meus pais, Sara e Arnaldo, pelo amor irrestrito e incondicional.

"O que está formado transforma-se de novo imediatamente e nós temos, se quisermos de algum modo chegar à intuição viva da Natureza, de nos mantermos tão plásticos como o exemplo que Ela nos propõe".

Goethe

Agradecimentos

Os agradecimentos dessa tese foram feitos com a intenção de refletir o quanto as pessoas que conviveram comigo durante a sua elaboração foram absolutamente importantes para a conclusão do trabalho. A cada etapa, não só diretamente relacionada à tese, mas também aos aspectos práticos da vida, dei-me conta do quanto tive apoio por parte de todos aqui citados e, acredito, que esses agradecimentos não serão suficientes para expressar o quanto sou grata. Por todas as circunstâncias que desenharam o período desses quatro anos e meio, seria impossível não contar com pessoas tão especiais.

Um inicial e principal agradecimento à minha orientadora, Prof. Dra. Helenice Mercier, que ao longo de 10 anos me deu exemplos que passaram a fazer parte da minha vida. Uma pessoa especial, que eu agradeço não só pela orientação, sempre tão presente, mas principalmente pela oportunidade de ter estado ao seu lado durante esses anos. Muito obrigada pela amizade, pela atenção e pela dedicação.

Professor Gilberto B. Kerbauy, com quem tive uma convivência que se acentuou ao longo dos anos e cujos ensinamentos sempre se voltaram ao amor pela ciência. Agradeço por ter sido sempre tão amigo, por ajudar em todos os momentos de incertezas e de difíceis decisões, e por me mostrar que o nosso esforço é sempre em favor de uma ciência que vale muito a pena em fazer.

À Profa. Dra. Marie-Anne Van Sluys, pela amizade cultivada, pela atenção incondicional e pelas sugestões científicas, fundamentais à conclusão da idéia do trabalho.

Ao Prof. Dr. Marcos S. Buckeridge, por ter sido sempre tão atencioso nas discussões dos resultados e pelo exemplo de um pesquisador científico.

Ao Prof. Dr. Antonio Figueira, pela oportunidade da agradável convivência que tive em seu laboratório e pela oportunidade de aprender técnicas de biologia molecular que complementaram de modo crucial a elaboração da tese.

À Dra. Jeanne B. M. Machado, que me ensinou e acompanhou toda a parte de biologia molecular da tese, se tornando uma amiga a quem devo um agradecimento especial. Obrigada pela atenção, pela dedicação e pelo exemplo de profissionalismo.

Ao Prof. Dr. Eduardo Purgatto, pela amizade, pelas discussões científicas desde o início do trabalho, bem como por possibilitar a dosagem de auxina em seu laboratório.

À Profa. Dra. Els Prinsen e ao Dr. Harry Van Onckelen, pela oportunidade de conhecer o laboratório de Biologia da Universiteit Antwerpen (Bélgica), pelos ensinamentos em espectrometria de massas e por terem concedido o laboratório por 3 meses para a análise de citocininas e auxina nas amostras referentes ao presente trabalho.

À Profa. Dra. Lurdes do Amaral, pela amizade conquistada nesses anos e pela ajuda na elaboração da dosagem de açúcares.

Ao Prof. Dr. Carlos Frederico Menck, por gentilmente possibilitar o uso do laboratório para a análise de incorporação de timidina. Agradeço ao Luis Zirnberger e à Dra. Hana Paula Masuda, pela atenção em terem me acompanhado na elaboração dessa metodologia.

À Profa. Dra. Nanuza L. de Menezes, pelo exemplo de dedicação e pela oportunidade de conviver com sua alegria contagiante.

À Profa. Dra. Jane Kraus, uma grande amiga, cujos ensinamentos me fizeram ser privilegiada por tê-los recebido ao longo desses anos.

Aos amigos da sala 112, um lugar que será sempre guardado na memória: Camila, Cássia, Cíntia, Aline, Alessandra, Giovanna, Amanda, Patrícia e em especial à Aline Cavalari, pela amizade e pela ajuda na metodologia de determinação de amido e à Thais R. Semprebom, tão atenciosa no que fosse preciso em ajudar. À amiga Kátia O. Campos, aos agradáveis 10 anos de convivência e pela amizade nesse tempo formada.

Aos amigos Maria Aurineide Rodrigues e Luciano Freschi, pela amizade conquistada e por sempre me ajudarem, nos momentos mais difíceis, mais conturbados, mais impossíveis.

Às amigas Patrícia Soffiatti, Marina Cattai e Érika Amano, pela divertida amizade e pelos conselhos científicos. Agradeço também à Soffi, pela ajuda na elaboração do Abstract.

Aos amigos, que já fizeram parte da sala 112: Regina Hamasaki, Catarina Nievola, Adélia Kitakawa, Vivian Tamaki, Rogério Suzuki, Ana Paula Vaz e, em especial ao Wagner Melo, pela agradável amizade.

À Priscila, por ser sempre tão amiga e pela ajuda, sempre presente.

À Rosete Pescador, uma amizade conquistada ao longo dos anos, se tornando especial.

Aos amigos da sala 153, que sempre ajudaram nos experimentos e idéias de biologia molecular: Regina Hashimoto, Marisa Momoli, Myna Nakabashi, Maria Alice e Douglas.

À Dra. Ana Paula Costa, Dra. Hana Paula Masuda e Msc. Érika Jesus, pela constante ajuda e infindáveis discussões referentes às questões moleculares.

Ao amigo Dr. Renato R. Ferreira, pela amizade e pelo apoio nos momentos "CENA/Piracicaba".

À Claudete Santa Catarina, pela agradável amizade e por seu exemplo de dedicação.

Às amigas de escola, Andréa, Luciana e Sandra, pela sincera amizade e compreensão dos meus momentos ausentes.

À técnica do Labotarório de Fisiologia Vegetal, Ana Maria Rodrigues, uma pessoa muito especial, que jamais deixou de ajudar. À Leonor, sempre disposta em colaborar.

Aos funcionários do Instituto de Biociências/USP, pela atenção e gentileza em ajudar no que fosse necessário.

Ao meu irmão Gustavo Maia Souza, pela amizade e pelos conselhos científicos que sempre fizeram parte da minha formação profissional.

À Capes, pela concessão de dois anos de bolsa de Doutorado.

À Fapesp, pela concessão de dois anos de bolsa de Doutorado.

E, finalmente, mas principalmente ao Eduardo, pelo companheirismo e pelo inegável exemplo de vida.

I. Introducão	12
I.1 A divisão celular em plantas	12
I.2 A sinalização em plantas.	20
I.3 Fatores que atuam no ciclo celular	22
L3.1 Os hormônios vegetais	23
I 3.1.1 Citocininas	25
I 3 1 7 Auvings	30
I 3 1 3 Ácido Abecísico	34
I 2 2 A giagrag	26
I.J.2 Açucaits	40
I.5.4 Ammodeliuos	40
1.4 O CICIO celular e os mensiemas	42
II. Objetivo	47
III Matarial a Métadaa	10
	48
III.1 Obtenção do material botanico	48
III.1.1 Estabelecimento do cultivo <i>in vitro</i>	48
III.1.2 Obtenção dos explantes	50
III.1.3 Coleta dos explantes	52
III.2 Análise hormonal	53
III.2.1 Análise de citocininas (LC/MS-MS)	54
(citocininas cisZ, transZ, cisZR, transZR, iP, iPR, iPRMP, iP9G, DHZ, DHZR, DHZRMP, DHZ9G)	54
III.2.1.1 Preparo da Sephadex	54
III.2.1.2 Extração	55
III.2.1.3 Purificação	56
III.2.1.4 Dosagem	60
III.2.2 Análise de citocininas (iP, iPR, Z e ZR), AIA e ABA (HPLC - ELISA)	61
Análise de AIA (HPLC - GC-MS-SIM)	61
III.2.2.1 Obtenção e fracionamento dos extratos	61
III 2.2.2 Dosagem	64
III 2 2 2 Dosagem de citocininas (iP iPR Z e ZR) AIA e ABA (FLISA)	64
III 2 2 2 h Dosagem de AIA (GC-MS-SIM)	65
III 3 Análisa da acúcaras solúvais	66
III 3 1 Extração dos asema o qualificação dos carboidratos andóganos	00
III.5.1 Exitação, dosagem e quanticação dos carboidiatos endogenos	68
III.4 Analise de aminoásidas livras	60
III.5 Allalise de aminoácidos livres	60
III.5.1 Extração de animoacidos tivies totais.	09
III.5.2 Quantificação de aminoacidos livres totais	09 70
III.5.5 Fracionaliento e dosagem dos aminoacidos nvies	70
III.6 Analise molecular	12
III.6.1 Analise da expressão dos genes CycD2;1 e H2A em R1 – qPCR	12
III.6.1.1 Obtenção dos oligonucleotideos	72
III.6.1.2 Extração de RNA total	73
III.6.1.3 Quantificação do RNA total	74
III.6.1.4 Tratamento com DNAase	75
III.6.1.5 Síntese de cDNA	75
III.6.1.6 Sequenciamento dos fragmentos amplificados por PCR	76
III.6.1.7 Análise em Real – Time qPCR (RT-qPCR)	77
III.6.2 Análise do conteúdo de DNA	79
III.6.2.1 Extração de DNA	79
III.6.2.2 Tratamento com RNAase	80
III.6.2.3 Quantificação do DNA genômico	80
III.6.2.3a Método por fluorimetria.	80
III.6.2.3b Método por RT-gPCR	81
III.6.3 Obtenção de um cDNA parcial codificando para a proteína ciclina B (CvcB1:2) através do uso de	
oligonucleotídeos degenerados.	82

Índice

III.7 Determinação da fase de replicação do material genético	
III.8 Análise Estatística	
IV. Resultados	
IV.1 Análise hormonal endógena	
IV.1.1 Citocininas	
IV.1.2 Ácido Indolil-3-Acético - AIA	
IV.1.3 Balanço hormonal AIA/Citocininas totais (AIA/CITs)	
(AIA/iP + iPR + Z + ZR)	
IV.1.4 Ácido Abscísico	
IV.2 Açúcares solúveis	
IV.3 Amido	
IV.4 Aminoácidos	
IV.5 Análise da expressão dos genes CycD2;1 e H2A em Real Time-qPCR	
IV.6 Análise do conteúdo de DNA	
IV.7 Incorporação de [H ³]timidina	
V. Discussão	
V.1 Hormônios	
V.1.1 Citocininas	
V.1.2 Auxina	
V.1.3 Balanço AIA/CITs	
V.1.4 Ácido abscísico	
V.2 Açúcares	
V.3 Aminoácidos	
VI. Conclusões	
VII. Perspectivas	
1	
VIII. Resumo	
IX. Abstract	
X. Anexos	
Anexo 1	
Anexo 2	
Anexo 3	
XI. Referências Bibliográficas	

Lista de Abreviaturas

- ABA ácido abscísico
- ABTS 2,2'-azino-bis(3-etilbenziltiazolina-6-ácido sulfônico)
- AC1 anticorpo primário
- AC2 anticorpo secundário
- AgF antígeno (hormônio vegetal) fixado
- AgL antígeno (hormônio vegetal) livre
- AIA ácido indolilacético ou ácido indolil-3-acético
- ANA ácido α-naftaleno acético
- BA benziladenina
- BAP 6-benzilaminopurina
- BHT butil-hidroxi-tolueno ou hidroxitolueno butilado
- BrdU bromodeoxiuridina
- CDC cinase dependente de ciclina; tradução de CDK, cyclin dependent kinase
- cDNA fita de DNA complementar
- CITs citocininas
- CTAB tampão de extração de DNA, hexadecyl trimethyl-ammonium bromide
- Cyc ciclina; do inglês: cyclin
- DEPC dietilpirocarbonato
- D.O. densidade óptica
- DHZ dihidrozeatina
- DHZR dihidrozeatina-9-ribosídica
- DHZRMP dihidrozeatina-9-ribosídica-5'-monofosfato
- DHZ9G dihidrozeatina-9-glicosídica
- DNA ácido desoxirribonucléico
- dNTP 2'-desoxinucleotídeo 5'-trifosfato
- EDTA ácido etilenodiaminotetracético
- ELISA teste de quantificação por anticorpos específicos, no qual a revelação é feita por uma enzima ligada a um anticorpo; do inglês: Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
- fmol fentomol (10^{-15} mol)
- GAPDH gliceraldeído-3-fosfato
- G1 intervalo G1 do ciclo celular; do inglês: gap 1

G2 – intervalo G2 do ciclo celular; do inglês: gap 2

- GC-MS-SIM cromatografia a gás seguida de cromatografia de massas e monitoramento seletivo de íons; do inglês: Gas Chromatography-Selected Ion Monitoring-Mass Spectrometry
- HPAEC cromatografia líquida de alta precisão de troca iônica; do inglês: High Performance Anion Exchange Chromatography
- HPLC cromatografia líquida de alta precisão; do inglês: High Performance Liquid Chromatography
- iP isopenteniladenina
- iPR (ou [9R]iP) isopenteniladenosina-9-ribosídica, ou isopenteniladenosina
- iPRMP isopenteniladenina-9-ribosídica-5'-monofosfato
- iP9G isopenteniladenina-9-glicosídica
- LC/MS-MS cromatografia líquida acoplada espectrometria de massas; do inglês: Liquid Chromatography`/Mass Spectrometry-Mass Spectrometry
- M mitose
- MCA metanol : clorofórmio : água
- MF massa fresca
- MOPS tampão ácido 4-morfolino propano sulfônico
- MS meio de cultura de Murashige & Skoog (1962)
- NaN3 azida sódica
- OVA ovoalbumina
- pb pares de base
- PBS tampão fosfato salino
- PCR reação de polimerização em cadeia; do inglês: Polimerization Chain Reaction
- pmol picomol (10^{-12} mol)
- PVPP polivinilpirrolidona
- Rib 18S proteína ribossomal 18S
- RNA ácido ribonucléico
- RNAm RNA mensageiro
- RT qPCR PCR quantitativa em tempo real; do inglês: Real Time quantitative PCR
- S fase S, de síntese do ciclo celular
- TCA ácido tricloroacético

TEA – ácido trietilamina Tris-HCl – tampão tris (hidroximetil) aminometano hidroclorídrico UV - ultravioleta Z - zeatina ZR (ou [9R]Z) – zeatina-9-ribosídica

I. Introdução

I.1 A divisão celular em plantas

Durante o desenvolvimento de organismos multicelulares, diferentes tipos de células são originados como conseqüência de sucessivos ciclos de divisão celular e de processos de diferenciação celular característicos. As bases moleculares da regulação da divisão celular vêm sendo elucidadas utilizando a levedura como modelo de estudo. Os mecanismos básicos são conservados entre procariontes e eucariontes, sendo que nas plantas a maioria dos componentes do ciclo celular foi identificada no início dos anos 90 (STALS & INZÉ, 2001).

No programa do ciclo celular, denominado de ciclo mitótico, ocorre a replicação do DNA (ácido dexorribunucléico) (chamada de fase S, ou de síntese), seguida da segregação do material genético replicado em duas células filhas (fase M, ou de mitose). Tanto a fase S quanto a fase M são precedidas por duas fases (intervalos) de preparo do material genético (G1 - "gap" 1 e G2 - "gap" 2, respectivamente), durante as quais as condições necessárias à divisão são monitoradas para uma nova replicação do DNA e entrada em mitose (VERKEST *et al.*, 2005). O esquema a seguir, representa as etapas do ciclo celular:



(modificado de Doerner, 2000)

A fase G1 do ciclo celular ocorre entre a fase M prévia e a entrada na próxima fase S, enquanto que a fase G2 separa a fase S da fase M subseqüente. Células na fase G2 basicamente se distinguem daquelas da fase G1 por apresentarem o material genético (conteúdo do DNA) já duplicado. A fase G1 é uma fase crucial do ciclo celular, na qual as células integram uma série de sinais que ativarão o programa de divisão, tornado-se comprometidas à duplicação do genoma e eventualmente à divisão. Já na fase G2 ocorre o preparo do DNA, com a reorganização do citoesqueleto celular, que permitirá a segregação adequada dos cromossomos na mitose (DEWITTE & MURRAY, 2003).

Importantes controles atuam nas transições G1/S e G2/M, o que evita uma replicação incompleta do genoma, ou a replicação do DNA sem que ocorra a divisão celular ou ainda que ocorra a divisão da célula anterior à replicação. Assim, existem mecanismos moleculares para monitorar a progressão do ciclo celular nesses pontos de transição, denominados de "checkpoints", ou pontos de controle, primeiramente descrito para as plantas por VAN´T HOFF (1966). Nesses pontos, a célula pode entrar em divisão, se diferenciar, entrar no programa de morte celular programada (PCD) ou manter-se na fase denominada G0, na qual as células estão quiescentes (MEIJER & MURRAY, 2001).

Nos pontos de controle, os mecanismos moleculares atuam a partir de mudanças na atividade de complexos de proteínas, dentre elas as cinases dependentes de ciclinas (CDCs) e sua subunidade catalítica, as ciclinas (Cyc, do inglês "cyclin"), sendo que a especificidade de ligação CDC-Cyc é um mecanismo regulatório básico nas diferentes fases do ciclo celular. O complexo CDC-Cyc fosforila uma série de substratos desencadeando a progressão do ciclo celular (DEWITTE & MURRAY, 2003; VERKEST *et al.*, 2005).

As cinases dependentes de ciclinas, CDC

A primeira CDC descrita foi a CDC2 em *Schizosaccharomyces pombe* (HINDLEY & PHEAR, 1984), sendo identificadas subseqüentemente outras CDC homólogas em plantas, com a diferença de que na levedura apenas uma CDC2 atua em todas as fases do ciclo e nas plantas há tipos específicos para cada fase (ZHANG & LEMAUX, 2004).

Em *Arabidopsis thaliana* foram identificadas pelo menos duas classes de CDCs envolvidas na regulação do ciclo celular, CDC do tipo-A (CDC-A), representada por um gene nessa espécie, CDCA;1 e a CDC do tipo-B (CDC-B), específicas de plantas e representada por uma família de genes com 4 membros, agrupados nas subclasses B1 (CDCB1;1 e CDCB1;2) e B2 (CDCB2;1 e CDCB2;2). As CDCs-A possuem atividade no final da fase G1 até o final da fase M, sugerindo uma participação nas transições G1/S e G2/M, sendo que as CDC-B possuem um pico de atividade somente na transição da fase G2/M (VERKEST *et al.*, 2005).

As Ciclinas

As ciclinas são proteínas consideradas subunidades catalíticas das CDCs, regulando a atividade dessas através da formação de complexos CDC-ciclinas. Atuam basicamente nas transições de G1 para S e G2 para M, bem como na entrada no ciclo de células que não estão em divisão. A ativação seqüencial de diferentes complexos CDC-ciclinas regula a transição do ciclo (MIRONOV *et al.*, 1999).

Para a atividade da CDC é necessária sua ligação com as proteínas ciclinas. Foram já identificados 49 diferentes tipos de ciclinas em plantas de *A. thaliana*, classificadas em 7 diferentes subclasses (A, B, C, D, H, P e T) (VERKEST *et al.*, 2005).

As ciclinas do tipo-A (CycA1, CycA2 e CycA3), atuam na fase S e são degradadas por ubiquitinação na transição G2/M. As ciclinas do tipo-B, identificadas nas subclasses CycB1 e CycB2, controlam a transição G2-M, formando complexos com CDC-A ou CDC-B, sendo degradadas no final da mitose (DEWITTE & MURRAY, 2003; DE VEYLDER *et al.*, 2003).

Já as ciclinas do tipo D (identificadas em 7 tipos), atuam na transição G1/S formando complexos com CDC-A, sendo que algumas se acumulam somente em G1 e se degradam rapidamente no início da fase S. Diferentemente das ciclinas dos tipos A e B, as ciclinas D não são abundantes e não apresentam uma expressão cíclica, ou seja, sua presença depende de sinais extracelulares que induzem a divisão celular, incluindo hormônios e açúcares. Sendo assim, na ausência dos sinais indutores, essas ciclinas têm seus níveis reduzidos rapidamente na célula, resultando na parada do ciclo celular na fase G1 (COCKCROFT *et al.*, 2000; DEWITTE & MURRAY, 2003). A ciclina CycD3 atua na entrada da fase S em resposta a sinais hormonais (RIOU-KHAMLICHI *et al.*, 1999), enquanto que a ciclina CycD2 atua na fase G1 e responde à disponibilidade de açúcar (SONI *et al.*, 1995).

A presença de ciclinas na célula depende de um controle transcricional e um controle pós-traducional altamente regulados, sendo que o processo de degradação dessa proteína é também um forte fator controlador de sua atividade. A maioria das ciclinas é reciclada rapidamente nas células, sendo degradadas no citossol pelo complexo proteossômico. Antes, são marcadas para destruição por meio de uma ligação com a proteína ubiquitina. A ubiquitinação é um processo geral de marcação de proteínas celulares destinadas à degradação, sendo a principal forma de reciclagem de proteínas numa célula (MIRONOV *et al.*, 1999; DEWITTE & MURRAY, 2003).

Como comentado anteriormente, a atividade das CDC é regulada pela sua ligação com as ciclinas e pelo processo de degradação por ubiquitinação, mas também pode ser

15

dependente da regulação mediada por uma cinase ativadora de CDC (CAC) através de uma fosforilação ativadora, bem como por sua ligação com cinases inibidoras de CDC (CIC) através de uma fosforilação inibitória (DEWITTE & MURRAY, 2003).

As CICs controlam a progressão do ciclo celular inibindo a atividade do complexo CDC-ciclina antes das transições, causando a parada temporária do ciclo, o que ocorre em resposta a sinais intra ou extracelulares. Essa inibição é descrita como reversível. As CICs podem também se ligar diretamente à ciclina ou à CDC. Em *A. thaliana* já foram identificados 7 genes que codificam proteínas CIC, homólogas às KRPs ("Kip Related Proteins") encontradas em animais (DEWITTE & MURRAY, 2003).

A progressão para G1, ponto crucial no ciclo celular, depende da fosforilação da proteína do tipo retinoblastoma (RB), homóloga a proteína supressora de tumor RB em animais. Esse processo é mediado pela CAC em coordenação com ciclinas do tipo D (DE VEYLDER *et al.*, 2003).

A progressão na fase S depende da atividade dos fatores de transcrição E2F, entretanto, durante a fase G1 esses se encontram ligados às proteínas RB. A fosforilação das proteínas RB, mediada por CDCA-ciclinas D, resulta na liberação do complexo RB-E2F, levando à ativação de E2F que irão assim, controlar a transcrição de genes necessários à progressão do ciclo celular e também de outros processos celulares, como na iniciação da replicação do DNA e na atividade de componentes do complexo de pré-replicação (DE VEYLDER *et al.*, 2003).

À medida que ocorre a replicação do DNA, há a progressão de G2 para M, necessitando da atividade de CDC-ciclinas B e CDC-ciclinas A. A atividade mitótica dos complexos CDC-Cyc é modulada pela fosforilação inibitória por cinases, como a WEE1, e

pela desfosforilação ativadora por fosfatases, sendo a CDC25, uma fosfatase ativa nesse momento, similar à encontrada em células animais, (DE VEYLDER *et al.*, 2003).

Histonas

Nas células, o núcleo é o local de armazenamento e replicação dos cromossomos. Esses são constituídos de DNA e de proteínas associadas, como as histonas, formando um complexo DNA-proteínas, denominado de cromatina. Como o tamanho linear do DNA no vegetal é sempre bem maior do que o tamanho do núcleo no qual se encontra, ele deve ser condensado. O condensação se dá pelo enrolamento da dupla hélice do DNA em torno das histonas, formando os nucleossomos. As histonas são uma família multigênica de proteínas nucleares conservadas entre os organismos participantes do processo de condensação da cromatina. Podem ser classificadas em 5 subtipos: H1, H2A, H2B, H3 e H4 (MESHI *et al.*, 2000).

HUH et al. (1997) classificaram as histonas em duas classes baseando-se no seu padrão de expressão. A primeira classe inclui as histonas que são expressas de modo dependente da replicação, predominantemente expressas na fase S e associadas à síntese de DNA. Quando não somente o DNA cromossomal como a estrutura da cromatina são replicados, há um aumento de duas vezes no total dessas histonas. A outra classe inclui as histonas que se expressam independentemente da replicação, são consideradas tecido-específicas, expressas constitutivamente durante o ciclo celular ou de forma transiente pós-proliferação e após o início da diferenciação celular, associadas com respostas epigenéticas.

Exceto em eritrócitos de mamíferos e componentes de elementos vasculares nas plantas, os componentes da cromatina estão presentes em todas as células vivas. A síntese da cromatina não é um processo contínuo, inicia-se no final da fase G1 e progride na fase S do ciclo celular ou durante a endoreplicação do DNA. As histonas H2A, H2B, H3 e H4 estão entre as mais abundantes e mais conservadas proteínas nos organismos e o RNAm (RNA mensageiro) é geralmente sintetizado de modo dependente do ciclo celular, no início da fase S ou ainda no fase G1 (KONING *et al.*, 1991).

As histonas dos tipos H3 e H4 primeiramente interagem entre si no processo de condensação da cromatina. Nas plantas, enquanto todas as histonas H4 têm basicamente a mesma seqüência de aminoácidos, as histonas H3 consistem de duas ou mais variantes, podendo ser expressas independente da replicação ou em tecidos com baixa taxa de proliferação. Entretanto, as histonas H1 e H2A são expressas de modo dependente de replicação (MESHI *et al.*, 2000). Foi possível isolar o cDNA (DNA complementar) do gene da histona H2A em tomate e ervilha (KONING *et al.*, 1991), em *Picea abies* (SUNDAS *et al.*, 1995), em trigo (HUH *et al.*, 1997) e recentemente em abacaxizeiro (MOYLE *et al.*, 2005), indicando ser um tipo de histona dependente do ciclo celular, com alta expressão em tecidos meristemáticos no fim das fases G1 e S e em ciclos endomitóticos.

Em relação à regulação gênica, as mudanças dinâmicas na estrutura local da cromatina têm sido estudadas com particular interesse, bem como as modificações pós-traducionais, como fosforilação e acetilação e posicionamento do nucleossomo. Estudos mostraram que a regulação das histonas é tanto transcricional quanto pós-transcricional, sendo que nas plantas as histonas possuem características em comum na sua estrutura e expressão, com domínios conservados, sendo por isso, consideradas específicas de plantas (MESHI *et al.*, 2000).

Após a expressão de genes de histona na fase S há a necessidade do controle de seus níveis nas células a partir da degradação específica de RNAm de histonas na fase S/G2. Nas plantas, o RNAm de histonas são poliadenilados (cauda poli-A) na terminação 3´, sendo que nos animais essa porção possui uma estrutura em "loop" especial em "T-hyphenated", ao

invés de uma cauda poli-A (MESHI *et al.*, 2000). Próximo ao final da fase S, uma redução nos níveis de RNAm de histonas pode ser observado em cultura de suspensão de células de tabaco, o que foi atribuído à degradação específica de RNAm de histonas (REICHHELD *et al.*, 1995), bem como à redução da atividade transcricional (REICHHELD *et al.*, 1998).

Estudos mostraram que os genes de histonas são predominantemente expressos em meristemas e tecidos com alta taxa de proliferação celular, como ápices caulinares e radiculares, folhas jovens, cotilédones, tecidos vasculares, gemas florais, embriões e cultura de células, sendo que a relação entre a expressão de genes de histonas e a síntese de DNA foi demonstrada em muitos trabalhos. Alguns estudos foram realizados em cultura de suspensão de células sincronizadas, outros em meristemas.

KONING *et al.* (1991) utilizando a técnica de hibridação *in situ*, verificaram níveis de expressão em tecidos meristemáticos de tomate. Foram verificados teores de RNAm de genes de histonas H2A em células de tecidos com baixa proliferação e em células que não estão em divisão. Isto pode estar relacionado à endoreplicação do tecido ou também à expressão de histonas independente da replicação, principalmente em órgãos relacionados à reprodução ou em resposta à estímulos externos, que não estariam relacionados com a proliferação e síntese de DNA.

SUNDAS & ENGSTROM (1995) também utilizando técnica de hibridação *in situ* demonstraram a correlação entre a divisão celular e a expressão do gene da histona H2A durante os primeiros estágios de formação de gemas adventícias em embriões de plantas da conífera *Picea alba*. Esses autores verificaram um padrão de expressão de H2A associado com a atividade mitótica aumentada nos tecidos analisados em embriões germinados induzida por citocininas, sugerindo que a expressão desse gene é dependente do ciclo celular, sendo um marcador de células em divisão. Foi caracterizada uma zonação diferenciada na gema,

possuindo regiões com células em baixa taxa de proliferação nas quais não foi identificada a expressão de gene H2A.

Em um outro trabalho, CALLARD & MAZZOLINI (1997) estudaram as mudanças na expressão de genes associados na retomada à divisão celular e subseqüente progressão do ciclo em cultura de células de *A. thaliana*. Esses autores observaram conteúdos de RNAm do gene da histona H2A em alta quantidade associados com a proliferação celular, tanto na transição G1/S, quanto na fase S.

Recentemente, tem se reforçado a idéia de que os componentes do ciclo celular têm a sua expressão gênica influenciada diretamente por fatores endógenos, como hormônios vegetais, açúcares, dentre outros, que atuam como sinais nos pontos de controle do ciclo celular (STALS & INZÉ, 2001). É muito estudada a atuação de fatores intra e extracelulares que atuam na sinalização dos processos fisiológicos.

I.2 A sinalização em plantas

As plantas possuem alta plasticidade fisiológica e fenotípica, podendo responder a fatores (sinais) ambientais e endógenos, utilizando mecanismos com os quais percebem, traduzem e integram um grande número de sinais, cuja resposta fisiológica se dá de modo preciso por meio de vias de transmissão de sinais (RANJEVA & VIDAL, 2003).

A transmissão de sinal na célula vegetal tem sido descrita em muitos processos iniciados com a percepção de sinais exógenos, como calor, luz, patógenos e sinais endógenos, como hormônios, açúcares, dentre outros. Os diferentes sinais ambientais são integrados com os sinais endógenos pela célula vegetal por meio do processamento de diferentes vias de sinalização, desencadeando adaptações no metabolismo celular. Até então, a seqüência das

etapas bioquímicas, iniciada após a percepção do sinal, era representada por eventos de cascatas independentes. Recentemente, tem sido demonstrado que existem conexões entre as vias de transmissão de sinais representada por uma complexa rede de interações (GENOUD & MÉTRAUX, 1999; TREWAVAS, 2000).

De uma maneira geral, a resposta a um sinal específico nas plantas pode ser dividida em três eventos: a percepção do sinal, a geração e transmissão desse sinal e subseqüente mudanças nos processos bioquímicos. Na fase de percepção do sinal, esse se associa com os receptores, proteínas que percebem e se ligam ao sinal, desencadeando assim, uma via específica de sinalização (TREWAVAS, 2000).

A maioria dos receptores está presente na membrana plasmática, outros estão localizados no citossol ou em outros compartimentos celulares. São geralmente proteínas de membrana e se tornam ativos quando se ligam a uma molécula sinalizadora (o primeiro mensageiro), ativando componentes secundários (segundos mensageiros), amplificando assim, o sinal dentro da célula numa via específica de sinalização (TREWAVAS, 2000).

Os receptores mais estudados possuem na sua estrutura sete domínios hidrofóbicos, sendo que o sítio de ligação do sinal encontra-se em um desses domínios ou em uma região extracelular. Uma extremidade N-terminal está localizada externamente à célula e uma extremidade C-terminal encontra-se internamente. Em receptores do tipo proteínas de transmembrana, a região C-terminal do receptor é fosforilada por proteínas cinases, distintas com base na seqüência de aminoácidos que fosforilam, sendo por isso, classificadas segundo esses aminoácidos: histidina, serina/treonina ou tirosina (TREWAVAS, 2000).

Quando há a ligação do sinal no receptor ocorre a ativação do domínio cinase, localizado na porção C-terminal, que transfere um fosfato (originado de uma molécula de ATP, adenosina trifosfato) para o resíduo histidina, serina/treonina ou tirosina, na sua maioria do tipo histidina composto por dois monômeros que se autofosforilam. Um segundo componente da via de transmissão de sinal, uma proteína reguladora de resposta, é ativada quando ocorre a transferência do fosfato para um resíduo aspartato presente no regulador de resposta. Na sua forma fosforilada, essa proteína desencadeia uma série de respostas celulares específicas ao sinal percebido. Esse mecanismo de transmissão de sinal é denominado de sistema de dois componentes, primeiramente descrito em procariontes, sendo que nas plantas é um sistema que, normalmente, inclui fosforilações subseqüentes adicionais (GREFEN & HARTER, 2004).

Com a disponibilidade de conhecimentos a respeito da sinalização em plantas brevemente aqui citados, os processos organogenéticos são estudados no que se refere ao controle da divisão celular exercido por sinais específicos. Sabe-se que os processos de divisão, diferenciação celular e crescimento são precisamente controlados, sendo iniciados por uma sinalização específica que desencadeia as primeiras divisões celulares na diferenciação de um órgão, garantindo o desenvolvimento coordenado do organismo.

I.3 Fatores que atuam no ciclo celular

Muitos trabalhos são feitos para a compreensão dos fatores envolvidos no controle da divisão celular, utilizando como modelo de estudo culturas de suspensão celular sincronizadas, havendo poucos trabalhos que abordam a sinalização da divisão celular em tecidos vegetais. Nesse caso, um dos modelos mais estudados é a influência de fatores endógenos no processo de indução da divisão celular na formação de meristemas e desenvolvimento de gemas axilares (ou laterais) após a eliminação da dominância apical, levando à perda da dormência (quebra da dormência) dos mesmos.

A quebra da dormência de gemas resulta na ativação da expressão de genes nas transições G1/S e G2/M do ciclo celular, a partir da ação de substâncias que atuam como sinalizadoras do ciclo celular (fitormônios, açúcares) e que irão regular a atividade de complexos específicos CDCs/ciclinas (STALS & INZÉ, 2001).

O processo de eliminação da dominância apical, e conseqüente do desenvolvimento de gemas, resulta no aumento das divisões celulares e mudanças no programa de desenvolvimento dos primórdios de gemas axilares, sugerindo que esses dois processos são regulados por fatores em comum. Nas plantas, células que não estão em processo de divisão, podem estar estacionadas tanto em G1, quanto em G2. Na maioria dos casos, as células meristemáticas de gemas dormentes estão estacionadas na fase G1, anterior à replicação da fase S. Assim, a quebra da dormência resulta no aumento da expressão de genes da fase G1/S, como ciclinas do tipo D e histonas, seguindo-se na fase G2/M com o aumento na expressão de ciclinas do tipo B (HORVATH *et al.*, 2003).

I.3.1 Os hormônios vegetais

Os hormônios são substâncias orgânicas que, sob baixas concentrações, regulam processos fisiológicos nos vegetais como o crescimento, a diferenciação e o desenvolvimento, inibindo ou estimulando esses processos (WEYERS & PATERSON, 2001).

Nas plantas, a regulação hormonal é um processo complexo, o que é evidenciado por interações entre diferentes hormônios no controle dos vários eventos fisiológicos (GAZZARRINI & MCCOURT, 2003). A interação auxina-citocinina é considerada uma das mais importantes na regulação do desenvolvimento vegetal assim como no desenvolvimento de raízes e gemas e no processo de dominância apical (EKLÖF *et al.*, 1997).

Dominância apical é o termo utilizado para definir o controle da gema apical sobre as gemas laterais (CLINE, 1994). Há muito já se estuda o envolvimento hormonal na dominância apical, cujos primeiros estudos se iniciaram com o trabalho de THIMANN & SKOOG em 1933. Os autores tinham o conhecimento de que com a retirada do ápice caulinar de uma planta, as gemas axilares iniciavam seu crescimento e que nesse processo haveria a influência de uma substância, de natureza semelhante à encontrada por Went em coleoptiles de Avena. Esses autores, utilizando plantas de Vicia faba, detectaram a presença dessa substância nas gemas terminais, sendo que em gemas laterais dormentes ela estava presente, no entanto, em menor quantidade. Após a decapitação das plantas, a substância tinha seus níveis reduzidos e as gemas laterais se desenvolviam. Assim, associaram a presença dessa substância à inibição do crescimento das gemas laterais. No ano seguinte, THIMANN & SKOOG (1934) mostraram que com a aplicação da substância, encontrada anteriormente, nos ramos decapitados de plantas de Vicia faba, ocorria a inibição do desenvolvimento das gemas laterais, da mesma forma como a gema terminal inibia em plantas intactas. Os autores sugeriram novamente um efeito inibitório para o grupo ao qual pertencia a referida substância, que mais tarde veio a ser conhecida como auxina. Posteriormente, THIMANN (1937), em um experimento também utilizando plantas de Vicia faba, demonstrou que com a remoção da gema terminal, as gemas laterais se desenvolviam. Essas começavam a produzir auxinas, que transportadas basipetamente, atuavam como um inibidor do crescimento das outras gemas laterais do ramo.

I. 3.1.1 Citocininas

As citocininas foram descobertas inicialmente como os fatores promotores de divisão celular, sendo que os estudos que se seguiram elucidaram a participação dessa classe hormonal como participante de muitos aspectos do desenvolvimento vegetal, como da germinação de sementes, diferenciação de cloroplastos, desenvolvimento de gemas laterais, indução de gemação adventícia (a partir de calos, discos foliares, hipocótilos ou seções internodais), ciclo celular, dominância apical, dentre outros eventos (SAKAKIBARA, 2006).

As citocininas ditas naturais são moléculas derivadas de adenina que possuem uma cadeia lateral de isopreno ou uma cadeia lateral aromática na terminação N^6 e são denominadas de citocininas isoprenóidicas ou aromáticas, respectivamente. Em ambos os tipos, a cadeia lateral apresenta variações, como a presença ou ausência de grupos hidroxilas. As citocininas isoprenóidicas, encontradas na maioria das espécies vegetais, são iP (isopenteniladenina), Z (zeatina) e DHZ (dihidrozeatina), a partir das quais derivam outras citocininas e suas formas conjugadas. Já as aromáticas são encontradas apenas em algumas espécies vegetais, como por exemplo, BA (benzilaminopurina), orto-topolina e meta-topolina, orto-metoxipolina e meta-metoxipolina (HWANG & SAKAKIBARA, 2006).

Formas conjugadas das citocininas são formadas a partir da adição de uma ribose ou ribose fosfato na posição N^9 do anel de adenina formando citocininas ribosídicas ou ribotídicas, respectivamente, dos tipos iP, Z e DHZ. A conjugação também pode ser resultado de uma glicosilação com a adição de um glicosídeo nas posições N^3 ou N^7 do anel de adenina. Os processo de interconversão dessas formas são um mecanismo importante de regulação do metabolismo dessa classe hormonal (AUER, 2002).

Com relação à biossíntese de citocininas isoprenóidicas, o primeiro passo é catalisado pela enzima IPTase (isopenteniltransferase adenosina fosfato). Essa enzima pode sintetizar iP

e Z (SAKAKIBARA, 2006). Até o momento já foram identificados em *A. thaliana* 7 genes de IPTase, sendo essa enzima encontrada em plastídeos, mitocôndria e citossol. Foi recentemente descrita em *A. thaliana*, uma via de síntese de Z independente de iP que utiliza um composto derivado da via do mevalonato, podendo ser uma via equivalente à de síntese de citocinina derivada do RNAt (RNA transportador). Essa última via foi descrita para algumas espécies de RNAt com anticódons complementares a códons que iniciam com uridina e que carregam uma adenosina adjacente ao anticódon; quando o RNAt é degradado, a adenosina é liberada. (ASTOT *et al.*, 2000).

A homeostase dos conteúdos de citocininas nas células é mantida pela liberação das citocininas de suas formas conjugadas, bem como pela degradação das formas conjugadas. A enzima citocinina oxidase é a principal responsável pela degradação irreversível a partir da quebra da cadeia lateral, havendo também as enzimas glicosiltransferases, que atuam inativando as citocininas por glicosilação (SAKAKIBARA, 2006).

O estudo das citocininas teve uma grande importância ao revelar sua função no controle do desenvolvimento vegetal e as bases moleculares de sua atuação como molécula sinalizadora. Em 2001, conhecido como "o ano das citocininas", INOUE *et al.* descreveram pela primeira vez um receptor na célula vegetal utilizando plantas de *A. thaliana*, denominado CRE1 ("Cytokinin Response 1"), que codifica para uma cinase do tipo histidina. Esse receptor reconhece algumas citocininas naturais, como iP, iPR (isopenteniladenosina), Z e BA (benziladenina), além de algumas citocininas sintéticas, como a cinetina e uma difeniluréia, conhecida como "Thidiazuron".

A via de sinalização de citocininas foi descrita contendo uma série de participantes: o receptor específico do tipo histidina cinase (CRE1), uma proteína de transferência de fosfato (AHP, "Arabidopsis Histidine-phosphotransfer Proteins") e proteínas reguladoras de resposta

(RR), isto é, os fatores de transcrição (RR-A e RR-B). Após a percepção do sinal (citocinina) pelo receptor, esse é auto-fosforilado, iniciando uma seqüência de etapas via proteína AHP, que modula a atividade das proteínas RR. As RR-B, localizadas no núcleo, interagem fisicamente com as AHP e regulam a atividade de genes ativados por citocininas, incluindo as RR-A, reguladoras da expressão de genes mediada por citocininas (AOYAMA & OKA, 2003; HWANG & SAKAKIBARA, 2006).

Vários trabalhos apontam para uma correlação positiva entre teores endógenos elevados de citocininas e o desenvolvimento de gemas laterais, a partir da indução de divisões celulares. Um dos primeiros estudos foi o de MILLER *et al.* (1955) que mostrou a participação de citocininas na promoção da divisão celular.

SOSSOUNTZOV *et al.* (1988) afirmaram que a concentração de citocininas em geral é alta em tecidos com mitose ativa, como meristemas radiculares e caulinares. Esses autores mostraram, por métodos imunocitoquímicos, que gemas axilares dormentes de tomateiro apresentavam uma correlação entre o baixo teor de citocininas encontrado e a quiescência das células meristemáticas e, ao contrário, um conteúdo maior de citocininas foi associado com a retomada do crescimento das gemas laterais.

Baseado em resultados de experimentos de aplicação de citocininas ou de introdução do gene *ipt* em células vegetais, VANKOVÁ (1999) mostrou que o teor de citocininas nas células competentes é um importante sinal à divisão celular e por conseguinte, ao desenvolvimento vegetal.

As citocininas promovem a divisão celular atuando na expressão de genes durante a progressão do ciclo celular, tanto na transição G1/S, quanto em G2/M (POZO *et al.*, 2005). D'AGOSTINO & KIEBER (1999) já haviam afirmado que a regulação da expressão do gene da

CycD3 pelas citocininas é um mecanismo-chave pelo qual essa classe hormonal promove a proliferação celular.

SONI *et al.* (1995) verificaram a atuação de citocininas na regulação da transição G1/S ativando a expressão da ciclina CycD3. Mais tarde, em um clássico estudo, RIOU-KHAMLICHI *et al.* (1999) demonstraram que a atuação promotora de citocininas no ciclo celular ocorreu a partir da ativação da ciclina D3 (CycD3), envolvida em G1/S em *A. thaliana*, o que aconteceu entre 1 e 2 horas antes do início da fase S. As citocininas Z e BA adicionadas à cultura de células promoveram a maior indução da expressão de CycD3. Nesse estudo, também foi realizada a análise da expressão do gene CycD3 por meio da hibridação *in situ*, indicando que esse gene é expresso em tecidos em proliferação no meristema apical, primórdio foliar e em gemas axilares.

Estudos sobre a atuação de citocininas na indução de divisões celulares caracterizam essa participação em fases posteriores à transição G1/S no ciclo celular. REDIG *et al.* (1996) analisaram a correlação entre a progressão do ciclo celular e os teores hormonais endógenos em suspensão de células sincronizadas de tabaco BY-2 e verificaram a participação de citocininas no fim da fase S (cerca de 3 horas) e na mitose (fase M, cerca de 7 horas). Esses autores sugeriram que a ação das citocininas, especialmente dos tipos Z e DHZ é baseada em uma interação com cinases e com complexos CDC-Cyc, que regulam a progressão do ciclo celular.

MADER & HANKE (1996) também verificaram que citocininas atuam em diferentes pontos do ciclo celular. Os autores utilizaram cultura de células de soja, parcialmente sincronizadas pela ação de hidroxiureia (HU) (inibidor da síntese de DNA), e utilizaram a técnica de imunolocalização com o anticorpo anti-BrdU (bromodeoxiuridina) para detectar a retomada da fase S, coincidente com o início de incorporação de BrdU. Foi verificado que na ausência de citocininas havia a parada do ciclo celular na fase S, ocorrendo apenas ciclos endomitóticos. Após a adição de citocininas foram verificadas diferentes populações de células, restabelecidas na fase M, bem como na fase S e na fase G1.

É muito conhecida a atuação das citocininas no ciclo celular na fase G2/M, dada pela ativação de uma fosfatase que remove uma fosforilação inibitória da cinase CDC2a (CDC do tipo-A) de leveduras. ZHANG *et al.* (1996) descreveram bem esse mecanismo utilizando cultura de células em suspensão de *Nicotiana plumbaginifolia*, que necessita de citocininas no final da fase G2, já que na sua ausência as células não progridem em G2, coincidindo com a redução da proteína p 34^{cd2} (produto do gene *cdc2a*). O controle da atividade da cinase CDC2a é dado pela citocinina que ativa a fosfatase CDC25, que remove o fosfato inibitório da tirosina no sítio ativo da p 34^{cd2} , levando à ativação da cinase e à retomada do ciclo. Esse trabalho mostrou que a fosforilação no sítio tirosina da proteína, inativa a cinase CDC2a. Foi reportado, ainda, que citocininas e auxinas atuam em conjunto, sendo que a auxina estimula o acúmulo dessa proteína no fim de G1 e as citocininas induzem a sua atividade no fim de G2, levando à progressão do ciclo.

HEMERLY *et al.* (1993), em um importante trabalho, estudaram o controle da expressão do gene *cdc2a* (homólogo ao de leveduras) em cultura de suspensão de células de *A. thaliana* e durante o desenvolvimento das plantas. O padrão de expressão desse gene esteve altamente correlacionado com o potencial de proliferação celular, apresentando redução na expressão à medida que as células se diferenciavam. Entretanto, essa redução não ocorreu na totalidade dessas células, já que há células totipotentes com capacidade para se dividirem novamente. Esses mesmos autores estudaram o efeito de sinais externos na expressão de *cdc2a* e verificaram um aumento na sua expressão em bases foliares de plantas de *A. thaliana*, fato atribuído à injúria causada no tecido, sugerindo que as células nessa região se tornam competentes à divisão. Os autores propuseram que a expressão de *cdc2a* pode refletir o estado de competência à divisão e que a expressão desse gene nem sempre pode estar associada com a proliferação celular, já que células meristemáticas quiescentes, mas competentes à divisão, podem apresentar altos níveis de expressão de *cdc2a*.

I.3.1.2 Auxinas

O ácido indolil-3-acético (AIA), principal auxina nas plantas, tem um papel-chave em processos do desenvolvimento vegetal, como na formação de raízes, dominância apical, tropismo e senescência, atuando também, como sinal para a divisão, alongamento e diferenciação celular (LJUNG *et al.*, 2002).

A molécula precursora da biossíntese do AIA é o triptofano e a via biosintética é constituída por sucessivas desaminações e descarboxilações oxidativas, sendo intermediários o ácido indolil–3-pirúvico e o composto indol-3-acetaldoxima. Entretanto, a biossíntese do AIA também pode ocorrer por uma via independente do triptofano (LJUNG *et al.*, 2002).

O metabolismo do AIA pode envolver processos de oxidação e conjugação que modificam o anel indol ou a cadeia lateral da sua molécula, levando à perda da atividade biológica do AIA. A conjugação pode ser considerada um processo catabólico, já que algumas formas conjugadas são irreversíveis e ocorre a partir da ligação do AIA com ésteres ou amidas. O catabolismo do AIA é um processo descarboxilativo e envolve a atividade de uma peroxidase, a AIA oxidase, entretanto a via não descarboxilativa é a principal no seu catabolismo (SLOVIN *et al.*, 1999).

Com relação às auxinas, CHEN (2001) ressalta a importância da proteína de ligação ABP1 ("Auxin Binding Protein 1"), que possui alta afinidade por auxina. Essa proteína de membrana atua no processo de expansão celular, sendo considerada como um possível receptor desse hormônio. Mais recentemente, foi descrita uma outra proteína que atua como um receptor do AIA, descoberto por dois grupos de pesquisadores, DHARMASIRI *et al.* (2005) e KEPINSKI & LEYSER (2005). Trata-se de uma proteína do tipo F-box SCF^{TIR1}, componente da via de degradação de auxina mediada por ubiquitinação (comentada a seguir), denominada TIR1 ("Transport Inhibitor Response 1"). Os autores descreveram que a partir de uma modificação conformacional do complexo SCF^{TIR1}, há a ligação da auxina na proteína então receptora TIR1. Essa foi uma descoberta muito interessante, pois indicou que o receptor de auxina é uma proteína que faz parte de seu próprio processo da degradação. VOGLER & KUHLEMEIER (2003) ressaltam também a participação de transportadores de auxina, localizados na membrana plasmática, que poderiam atuar como proteínas receptoras de AIA. Essas proteínas estão relacionadas com o influxo e o efluxo de auxina na célula, as proteínas AUX1 (AUXIN) e PIN1 (PIN FORMED1), respectivamente.

A via de sinalização do AIA foi descrita por KEPINSKI & LEYSER (2002) e detalhada posteriormente por VOGLER & KUHLEMEIER (2003). A expressão de genes regulada por auxina é mediada por duas famílias de fatores de transcrição: ARF ("Auxin Response Factor") e Aux/IAA ("Auxin/Indole-3-Acetic Acid"). As proteínas ARF se ligam aos reguladores de resposta à auxina, AuxRE ("Auxin Response Element"), ativando a expressão de genes mediada pela auxina. As proteínas Aux/IAA, por outro lado, reprimem a atuação dos ARF, pois podem se ligar a eles formando os dímeros Aux/IAA-ARF, inibindo a via de sinalização mediada por auxina. A molécula de AIA ativa esse sistema de sinalização, promovendo a degradação de proteínas Aux/AIA através de um complexo de degradação mediada por ubiquitina, no momento em que se ligam à proteína TIR1, permitindo a função dos ARFs.

Sabe-se que as auxinas regulam tanto o processo de divisão, quanto de alongamento celular. CHEN (2001) verificou que ambos eventos ocorrem por meio de vias de sinalização

distintas reguladas por auxinas, incluindo diferentes tipos de proteínas. A proteína de ligação ABP1 ("Auxin Binding Protein 1"), que possui alta afinidade por auxina, atua na expansão celular, enquanto que, mediado por um outra proteína com menor afinidade por auxina, o processo de divisão celular estaria acoplado à sinalização através de uma proteína heterotrimérica G. Evidências genéticas indicam que ambas as vias de sinalização, ABP1 ou proteína G, estão integradas para modular o processo de proliferação celular, garantindo o desenvolvimento da planta.

ULLAH *et al.* (2001) reforçaram a idéia de que proteínas do tipo-G são reguladores positivos da divisão celular em plantas de *A. thaliana*. Além disso, THOMAS *et al.* (2003) mostraram que transcritos de ABP1 são acumulados em células específicas durante a iniciação de raízes laterais de plantas de girassol, sugerindo que a sensibilidade à auxina é aumentada em células que iniciarão o processo de divisão, seguido de diferenciação celular.

Com o objetivo de melhor compreender a atuação das auxinas no processo de divisão celular, ZAZÍMALOVA *et al.* (1995) utilizaram culturas de células de tabaco dependentes de auxina e verificaram a taxa de crescimento da cultura sob diferentes concentrações de auxinas. Tanto na ausência total ou parcial de auxina no meio de cultura ocorreu uma redução da freqüência de divisões celulares. Nessas condições, foi verificado um aumento progressivo dos níveis endógenos de AIA a partir do início da fase exponencial de crescimento da cultura, quando foram observadas divisões celulares. Os autores sugeriram existir variação na sensibilidade das células a mudanças na concentração endógena de AIA durante o crescimento da cultura *in vitro*, controlando a divisão celular.

Em se tratando mais especificamente do ciclo celular, ROUDIER *et al.* (2003) verificaram que auxina regula a expressão da ciclina CycA2;2 durante o desenvolvimento de raízes primárias e secundárias (laterais) e no desenvolvimento de nódulos (acompanhado por

ciclos endomitóticos) em plantas de alfafa, cuja proliferação celular está associada com a formação de meristemas. Utilizando plantas transgênicas que continham o gene CycA;2 os autores verificaram a expressão desse gene no meristema e em células em proliferação no primórdio nodular e nas raízes laterais. A expressão gênica foi inibida em células em endoreplicação no nódulo, indicando não ser importante na fase S (ciclos endomitóticos permanecem em S). A expressão de CycA2;2 coincidiu com a atividade do meristema apical radicular, relacionada à indução por auxina, já que elementos de resposta à auxina (Aux/RE) estavam presentes no promotor da construção das plantas transgênicas. Os pesquisadores demonstraram ainda que a auxina regula o padrão de expressão espacial dessa ciclina especificamente nos pólos opostos de protoxilema durante a formação de primórdios radiculares laterais. Os autores concluíram que a expressão do gene da ciclina CycA2;2 é promovida por auxina, atuando na re-ativação do ciclo celular em células diferenciadas e está ligada à atividade meristemática, mais especificamente à transição G2/M.

Em um trabalho de revisão, VANNESTE *et al.* (2005) discutiram mais recentemente o papel da auxina no ciclo celular durante a formação de raízes laterais. Foram relatados trabalhos mostrando que a auxina endógena controla o posicionamento de primórdios de raízes laterais em plantas de *A. thaliana*, sendo que no início de sua formação, a auxina endógena é percebida por algumas células do periciclo (voltadas para os pólos de protoxilema). A desdiferenciação de algumas dessas células é iniciada e divisões celulares são intensificadas, sendo que somente algumas seguirão a via de diferenciação para a formação dos primórdios de raiz (CASIMIRO *et al.*, 2001; CASIMIRO *et al.*, 2003). Sabe-se que auxina induz o aumento dos teores de ciclinas dos tipos A, B e D, sendo que sua ativação depende da interação com outros hormônios, como citocininas e com sacarose (SONI *et al.*, 1995; FUERST *et al.*, 1996). BEECKMAN *et al.* (2001) mostraram que as células do periciclo em raízes laterais

de *A. thaliana* se mantêm em G1, sendo que as que irão formar a raiz lateral encontram-se em S ou G2, já que após 2 horas de indução por adição de auxina, notaram-se figuras mitóticas. Nesse momento, os autores verificaram maiores concentrações de ciclina do tipo-B (CycB1;1), um já conhecido marcador da transição G2/M.

Um outro aspecto importante sobre o papel de auxinas no ciclo celular é que essa classe hormonal atua na regulação da expressão de outros genes relacionados indiretamente com a progressão do ciclo, tanto na fase G1, quanto em G2. Exemplos podem ser citados, como o fator de transcrição E2F, que participa de ciclos de endoreplicação (transição G1/S), o gene HOBBIT, específico de G2/M e que codifica para um dos componentes do complexo promotor de anáfase (APC), cuja mutação afeta a divisão e a diferenciação celular, bem como respostas mediadas por auxinas (POZO *et al.*, 2005).

Outros estudos indicaram a atuação específica de auxinas na orientação dos microtúbulos de células em divisão, regulando o plano de orientação das células (SHIBAOKA, 1994), bem como nas propriedades da parede celular (MASUDA, 1990).

I.3.1.3 Ácido Abscísico

O ácido abscísico (ABA) desempenha uma série de funções nas plantas, como na embriogênese, no estabelecimento da dormência de gemas e sementes, na proteção à dessecação de sementes e na síntese de proteínas de reserva durante o desenvolvimento das sementes. É bem conhecido como a classe hormonal relacionada ao estresse, modulando o metabolismo das plantas às condições adversas de seca e de frio. Entretanto, ainda não é bem conhecido como o ABA desempenha essas funções em nível molecular (MCCOURT *et al.*, 2005).
Formado por um conjunto de 15 carbonos, o ABA pertence a uma classe de metabólitos do tipo isoprenóide, também chamados de terpenóides, derivados do metabolismo do isopentenil pirofosfato (IPP), que origina zeaxantina, violaxantina, neoxantina e xantoxina, esse último composto, oxidado em ABA. O IPP é sintetizado na via do ácido mevalônico, mas pode ser sintetizado por uma via independente dessa. A molécula do ABA possui um grupo carboxila no carbono-2, cuja orientação determina as suas formas *cis* e *trans*, sendo *cis* a forma mais comumente encontrada nos vegetais (NAMBARA & MARION-POLL, 2005).

O ABA pode se apresentar na forma oxidada ou conjugada com um monossacarídeo, como por exemplo, o ABA-glicosil éster (ABA-GE), sendo ambas as formas biologicamente inativas. Enzimas do tipo esterases podem atuar na sua desconjugação, entretanto, não há indícios de que a hidrólise do ABA-GE contribua para um aumento de ABA na forma livre. Assim como já comentado para as duas classes hormonais anteriores, os processos de biossíntese e catabolismo determinam a concentração ativa do hormônio na célula, mantendo a sua homeostase (LIOTENBERG *et al.*, 1999).

Até o momento, não foi identificada ainda uma proteína com características típicas de um receptor para o ABA, somente a proteína do tipo fator de transcrição ABI ("ABA Insensitive") que possui alta afinidade de ligação pelo ABA, sendo ABI3, o primeiro identificado. Estudos moleculares sugerem que ABI3 e ABI5 interagem diretamente na transcrição de genes que contém na sua região promotora, elementos de resposta ao ABA (ABRE, "ABA Responsive Element") (FINKELSTEIN *et al.*, 2002; MCCOURT *et al.*, 2005).

Sabe-se que o ABA atua como um inibidor no processo de crescimento de gemas laterais promovendo a inibição das divisões celulares. Muitos trabalhos indicam que o ABA diminui a atividade mitótica, atuando na expressão do gene ICK1, cujo produto é uma proteína inibidora de CDC, que interage com a cinase CDC2a na transição G2/M e com a

ciclina CycD3 na transição G1/S, inibindo a atividade dessas proteínas (WANG *et al.*, 1998). Mais recentemente, WANG *et al.* (2000) verificaram que em plantas de *A. thaliana* transgênicas as quais, expressam o gene ICK1, ocorreu uma redução na divisão celular das plantas, a partir da redução da atividade da cinase CDC2a, resultando em plantas com o crescimento alterado, células maiores, bem como a morfologia de folhas e pétalas alterada.

Outro trabalho que reforçou a indicação de que ICK atua na inibição da atividade de CDC foi o de CLEARY *et al.* (2002). Esses autores estudaram o efeito inibitório da ICK1 microinjetando a proteína em células vivas de estames de *Tradescantia virginiana* no final da prófase. Foi verificada uma redução da divisão celular correlacionada à um aumento na duração da mitose, já que células não microinjetadas tinham uma duração da mitose de 32 min, enquanto as microinjetadas com ICK1 levavam 74 min. Essa duração foi dependente da quantidade de proteína microinjetada. Os autores concluíram que ICK tem um efeito inibitório no ciclo celular, reduzindo o número de divisões celulares, como conseqüência do aumento de duração da fase M do ciclo celular. Foi sugerido que o efeito do aumento de tempo da fase M pela ICK é função da redução da atividade de CDC.

I.3.2 Açúcares

Os açúcares glicose, frutose e sacarose possuem um papel essencial no desenvolvimento vegetal, sendo participantes de várias etapas do ciclo de vida do vegetal, desde a germinação, crescimento, reprodução, bem como de processos metabólicos, como a respiração. São, ainda, substratos para a síntese de carboidratos complexos como o amido e a celulose. Além disso, os açúcares são moléculas construtoras para a biossíntese dos aminoácidos, lipídeos e outros componentes das plantas. São muito estudados como fontes

importantes de energia, componentes estruturais e ainda como moléculas sinalizadoras e reguladoras da fisiologia e da expressão gênica (SMEEKENS, 2000).

A sacarose é sintetizada nas folhas, exportada via floema, suprindo órgãos não fotossintetizantes com energia e fontes de carbono Esse açúcar é catabolizado pelas enzimas invertase e sacarose sintase (SUS, "Sucrose Synthase"). O resultado da quebra da sacarose pela invertase é a glicose e frutose. Essa enzima é responsável pela formação de hexoses em duas vezes mais que a sacarose sintase, a qual produz UDP glicose (uridina difosfato glicose) e frutose. De forma geral, as hexoses atuarão como sinalizadores de processos fisiológicos regulando a expressão de genes relacionados à divisão celular e a expansão celular. Já a sacarose regularia certos processos, como diferenciação celular e a maturação de sementes. Assim, o "status" de açúcar na célula, ou seja, a alteração da razão hexoses/sacarose determinaria a atuação de açúcares no desenvolvimento vegetal (KoCH, 2004).

A sacarose representa a principal forma de açúcar transportado nas plantas, dos locais de síntese (órgãos-fonte) para os de consumo do açúcar (órgãos-dreno). Dependendo do tecido, o açúcar pode ser transportado via plasmosdesmo (simplasto), ou atravessar a membrana plasmática como sacarose ou hexose (apoplasto). A entrada da sacarose na célula, via simplasto ou apoplasto, determina se sua quebra será mediada por invertases de parede celular, invertase citoplasmática, invertase vacuolar ou pela SUS (KOCH, 1996; SHEEN *et al.*, 1999).

Foram identificados em leveduras e animais receptores de hexoses, como glicose - as cinases do tipo hexocinases (HXK, "hexokinase"). Nas plantas foi descrito um sistema homólogo, no qual a fosforilação de hexoses mediada pelas HXK parece ser um importante mecanismo de sinalização de açúcares (JANG *et al.*, 1997). As hexocinases tipo serina/treonina, SnRK (homóloga a SNF1, "Sucrose Non Fermenting 1", descrito inicialmente

em leveduras) seriam receptores localizados na membrana plasmática que respondem ao estado nutricional da célula, atuando como receptores metabólicos para glicose (HELLMANN *et al.*, 2000). Há também uma via de sinalização independente da via por hexocinases, mediada por receptores de hexoses do tipo transportadores localizados na membrana, os RGT2 e SNF3, homólogos aos descrito em leveduras, que apresentam sensibilidade a altos ou baixos teores de glicose, respectivamente (ROLLAND *et al.*, 2002).

O transporte de açúcares pela membrana plasmática é um importante passo na sua percepção e está ligado ao mecanismo de sinalização dessas moléculas. Esse processo depende de uma família de proteínas transportadoras, sendo o transportador de sacarose SUT1 ("Sucrose Transporter 1") o mais estudado até o momento na sinalização por açúcares. A concentração extracelular de açúcar é percebida e a atividade do transportador é simultaneamente regulada, determinando o fluxo de entrada do açúcar na célula, que atuará como um sinal intracelular. Uma segunda família de transportadores de açúcares nas células é a de transportadores de hexoses (HXT), mais ativos em tecidos que funcionam como dreno (LALONDE *et al.*, 1999; WILLIAMS *et al.*, 2000).

Apontam-se os açúcares não só como nutrientes, mas também como sinais fisiológicos que inibem ou promovem a expressão de genes envolvidos em processos importantes no vegetal, incluindo a regulação do ciclo celular.

Em um clássico estudo com ápices radiculares de plantas de ervilha, VAN'T HOF (1966) mostrou que o suprimento de sacarose ao meio de cultura promovia a transição das células da fase G1 para a fase S, ou da fase G2 para a fase M, promovendo as divisões celulares. Para tanto, os autores determinaram o número de células em divisão e de células em síntese de DNA, a partir da incorporação de timidina triciada adicionada ao meio de cultura, na ausência de sacarose. Quando os ápices foram mantidos em meio sem carboidratos por 24

horas e depois por 48 horas houve uma acentuada redução de células marcadas com timidina, sendo que, após 72 horas na ausência de sacarose, não se verificou divisão celular. Após a adição de açúcar foram re-iniciadas a síntese de DNA e as divisões celulares, tanto nos ápices mantidos por 24 horas como por 72 horas na sua ausência. Esse autor sugeriu a existência de duas populações de células nos ápices: uma em G2 - já que nas células mantidas por 24 horas na ausência de sacarose observaram-se figuras mitóticas marcadas com timidina, e uma outra população em G1 - já que em algumas dessas células não se observaram figuras mitóticas.

A participação de açúcares na regulação da expressão de genes relacionados ao ciclo celular é relatada por muitos outros autores. Em *A. thaliana*, o principal ponto de controle do ciclo celular que responde ao estado nutricional ocorre em G1, mediado pelas ciclinas CycD2, CycD4 e CycD3 (STALS & INZÉ, 2001).

DE VEYLDER *et al.* (1999) constataram que a sacarose induz a expressão do gene da ciclina D4 (CycD4;1) na formação de primórdios radiculares laterais em *A. thaliana*, sugerindo a necessidade dessas ciclinas, aliadas com a cinase CDC2a, como fatores-chave durante a atividade do ciclo celular na formação dos primórdios radiculares.

Um outro aspecto importante é a correlação entre as vias de transmissão de sinal de açúcares em plantas com as vias de sinalização de hormônios, controlando o crescimento e desenvolvimento. Foi observado que a glicose é uma molécula sinalizadora fundamental no desenvolvimento vegetal e na expressão gênica de síntese de hormônios (KOCH, 2004).

LEON & SHEEN (2003) relataram exemplos nos quais mutantes de *A. thaliana* relacionados à sinalização de açúcares apresentaram respostas hormonais alteradas similares às encontradas em mutantes de biossíntese e sinalização dos hormônios ABA e etileno.

Para melhor compreenderem as vias de transmissão de sinal de glicose associada à ação hormonal do etileno, ZHOU *et al.* (1998), utilizaram o mutante insensível à glicose *gin1*

de *A. thaliana*. Nesse mutante, os processos mediados por etileno como germinação, esverdeamento e expansão dos cotilédones, desenvolvimento foliar e transição floral foram reduzidos. A inibição apresentada no mutante *gin1* foi recuperada por tratamento com o precursor do etileno.

Além da relação com o ABA e etileno, também foi verificada a atuação de açúcares em processos mediados por citocininas e auxinas (GIBSON, 2005).

I.3.4 Aminoácidos

O efeito dos nutrientes no crescimento e no desenvolvimento vegetal é muito estudado, sendo que trabalhos recentes que tratam da ação dos nutrientes nas plantas distinguem o papel dos mesmos como construtores de biomassa estrutural e de seu potencial como moléculas sinalizadoras. Nesse último caso, é importante determinar se a presença ou a ausência do nutriente é o sinal para um determinado processo fisiológico ou se a sinalização é proveniente de um metabólito derivado desse nutriente, já que em muitos casos, verifica-se que a disponibilidade de um certo nutriente pode influenciar a transcrição gênica. O nitrogênio é um elemento constituinte de importantes moléculas, recentemente consideradas sinalizadoras do desenvolvimento vegetal, como o nitrato, o amônio, bem como de produtos de assimilação do nitrogênio, como aminoácidos (CORUZZI & BUSH, 2001).

Todos os aminoácidos são derivados de intermediários da glicólise, do ciclo do ácido cítrico ou da via oxidativa das pentoses-fosfato, sendo que a entrada de nitrogênio nestas vias ocorre inicialmente através do glutamato ou da glutamina (CORUZZI & LAST, 2000).

A via de assimilação do amônio ocorre a partir da reação do glutamato com o amônio, formando glutamina pela ação da glutamina sintetase (GS) e, em seguida, por ação da enzima glutamato sintase (GOGAT), a glutamina reage com uma molécula de α -cetoglutarato,

formando duas moléculas de glutamato. A formação do glutamato a partir de α -cetoglutarato também pode ocorrer por ação da enzima glutamato desidrogenase. Após a assimilação do nitrogênio em glutamato e glutamina, o nitrogênio é distribuído para vários outros componentes nitrogenados, sendo que o grupo amino da maioria dos outros aminoácidos é derivado do grupo amino do glutamato através de reações de transaminações (CORUZZI & LAST, 2000; STITT *et al.*, 2002).

Os aminoácidos glutamato, glutamina, aspartato e asparagina são considerados nas plantas os principais aminoácidos de transporte (translocados pelo floema), ou seja, de transferência de nitrogênio de órgãos-fonte para tecidos-dreno. Os aminoácidos transportados são utilizados para a biossíntese de proteínas, que atuam na manutenção dos órgãos e são constituintes de reservas utilizadas no crescimento e desenvolvimento do vegetal (CORUZZI & LAST, 2000).

Nas plantas, os aminoácidos são considerados sinalizadores, tanto da concentração endógena de nitrogênio, como da relação carbono : nitrogênio (CORUZZI & BUSH, 2001).

Em um importante trabalho, LAM *et al.* (1998) localizaram no genoma de *A. thaliana* uma seqüência homóloga ao gene do receptor de glutamato encontrado em animais (iGluRs), o gene AtGLR (*Arabidopsis thaliana* "Glutamate Receptor"). DAVENPORT (2002) relatou a existência desse receptor em outras plantas, sendo que foram identificados 20 tipos diferentes no genoma de *A. thaliana*. Trata-se de um receptor que não é específico, podendo reconhecer também os aminoácidos glicina e glutamina. Essa proteína receptora foi descrita como sendo um canal de íons não-seletivo presente na membrana plasmática da célula vegetal (mais permeável para cátions que ânions, mas sem distinção para cátions monovelentes), tendo também papel na sinalização do cálcio. Mais recentemente, BOUCHÉ *et al.* (2003) relataram a possibilidade do GABA (ácido δ -aminobutírico) também ser reconhecido por esse receptor.

Alguns trabalhos relatam a participação dos aminoácidos em processos relacionados ao desenvolvimento vegetal, como a divisão celular, bem como na organogênese, indicando um possível papel como moléculas sinalizadoras.

Em um interessante trabalho, ROGGATZ *et al.* (1999) verificaram que a ausência de nitrogênio afeta o desenvolvimento foliar de *Ricinus communis* por meio da redução da divisão ou da expansão celular. Os autores sugerem que a divisão celular é altamente dependente da disponibilidade de nitrogênio na célula, sendo que células competentes à divisão na fase G1 possuem maiores níveis de síntese de proteínas, conteúdo de ribossomos e de RNA, diferindo-se das células que apenas estão em processo de expansão celular.

HAMASAKI *et al.* (2005) estudaram o processo de formação de gemas adventícias em bases foliares de *Ananas comosus* cultivadas *in vitro* em meio de cultura adicionado por 8 mM de glutamina (meio indutor de regeneração de eixos caulinares) durante 15 dias. Foi verificado que nos primeiros sete dias ocorreu o período de indução. Nesse período, houve a necessidade da presença de glutamina, sendo que o aumento na regeneração somente ocorria se esse aminoácido fosse adicionado ao meio de cultura logo no primeiro dia de incubação. Foi sugerido que a glutamina favoreceu a competência à organogênese dos explantes foliares, atuando possivelmente como um sinal promotor da regeneração nas bases foliares.

I.4 O ciclo celular e os meristemas

O processo de formação do corpo da planta envolve divisão e diferenciação celular, crescimento e morfogênese. A divisão celular é primariamente responsável por gerar o crescimento do vegetal, resultando em órgãos com tamanhos e formas específicos, ou seja, com uma diferenciação celular específica. Para tanto, há a necessidade de um controle

integrado entre a progressão do ciclo celular e os sinais que desencadeiam o desenvolvimento (HEMERLY *et al.*, 1999).

A divisão celular nas plantas adultas ocorre em um grupo pequeno de células, os meristemas, sendo constante o interesse no estudo dos mecanismos moleculares que controlam a divisão celular nesse locais. O processo de formação de meristemas sofre a influência de fatores endógenos que atuam diretamente, de forma espacial e temporal, em suas células (BOER & MURRAY, 2000).

O meristema é composto por células em proliferação, possuindo uma localização determinada. Comumente, distinguem-se entre meristemas primários e secundários, com base em uma classificação que leva em conta a origem dos mesmos. Meristemas primários são aqueles cujas células se desenvolvem diretamente a partir de células embrionárias e, assim, constituem uma continuação do embrião. São eles, o meristema apical radicular (MAR) e meristema apical caulinar (MAC). Os meristemas secundários são aqueles que se desenvolvem de tecidos maduros, os quais já se diferenciaram e que são originados num estágio pós-embrionário. São eles, os meristemas laterais, como o câmbio e as gemas axilares (ou laterais) (BOWMAN & ESHED, 2000).

As células dos meristemas apicais MAC e MAR têm dois papéis fundamentais: se dividirem para a manutenção de células indiferenciadas (células iniciais) e para fornecerem células para a diferenciação de tecidos precursores de novos órgãos. A tomada de decisão para a diferenciação depende de sinais específicos nas células (CASTELLANO & SABLOWSKI, 2005).

O MAC origina todos os tecidos que constituirão a parte aérea do vegetal formados pós-embriogênese. É uma estrutura altamente organizada, dividida em domínios distintos morfologicamente e com funções específicas: há uma zona central no topo do meristema, com a função de manutenção de células indiferenciadas e em constante divisão, constituída por três

camadas de células, denominadas L1, L2 e L3. Essas células são rodeadas por uma zona periférica, na qual são gerados continuamente novos primórdios de órgãos, como folhas; há também uma região medular, abaixo da zona central, responsável pela formação de tecidos caulinares. Assim, no meristema, as células dependendo da sua localização estão se dividindo, expandindo e diferenciando dinamicamente, de modo altamente coordenado (CARLES & FLETCHER, 2003).

As células localizadas na zona central, denominadas de iniciais, se dividem numa taxa reduzida, sendo que à medida que se proliferam se direcionam gradualmente para a zona periférica do meristema, onde as células se dividem mais rapidamente do que na zona central e são recrutadas à diferenciação de primórdios de órgãos (CASTELLANO & SABLOWSKI, 2005).

Assim, no MAC há padrões de organização celular, representando etapas distintas de divisão e diferenciação celular, que se estendem de células indiferenciadas da zona central do meristema até as células diferenciadas e que não passam a se dividir mais, constituindo os tecidos foliares e do caule. Esse balanço entre a manutenção de população de células em divisão e a passagem para o estado de diferenciação celular é mediado por genes específicos (CLARK, 2001).

No MAC são expressos genes responsáveis por sua característica meristemática. São eles, fatores de transcrição da família de proteínas homeobox KNOX, como os produtos dos genes KNOTTED1 (KN1) - a primeira família de genes homeobox isolada em plantas e identificada em mutantes de milho - e o gene SHOOTMERISTEMLESS (STM) - identificado em *A. thaliana*. Ambos, KN1 e STM são responsáveis por manter o estado indeterminado de algumas células do MAC. A expressão reduzida de KN1 nas porções do meristema que originarão as folhas determina a mudança de célula meristemática para células em diferenciação. Também foram identificados os genes ROOTMERISTEMLESS (RML1 e

RML2), cujo alelo mutante reduz o número de divisões no meristema radicular, resultando em raízes menores (CLARK, 2001). No MAR, também atua o gene PLETHORA (PLT), que codifica um fator de transcrição e cuja transcrição é mediada por auxina. Esse gene é responsável pela manutenção do estado indeterminado nas células do centro quiescente do meristema radicular, bem como das células vizinhas (KEPINSKI, 2006). O gene WUSCHEL (WUS) codifica para um fator de transcrição e é expresso nas células da zona central do meristema e tem como função a manutenção do número de células no estado indiferenciado, que se dividem e não se diferenciam. Os genes CLAVATA (CLV1, CLV2 e CLV3) atuam no controle do número de células no MAC, restringindo o seu acúmulo, funcionam como uma via de "feedback" negativo das células iniciais meristemáticas (CLARK, 2001).

No meristema, existe um controle mediado pelos produtos dos genes acima citados, garantindo o equilíbrio no número de células e a sua manutenção. Para tal função, os genes CLV atuam em conjunto com os fatores promotores de divisão, codificados pelo gene WUS. O RNAm do gene CLV3 é enviado via plasmodesmos nas camadas constituintes da zona central L1 e L2 onde é codificada a proteína que se direciona para a camada L3 e que atua como ligante para o complexo de sinalização formados pelo produto dos genes CLV1 e CLV2. O RNAm do gene WUS é transcrito na camada L3 e codifica um fator de transcrição que regula positivamente a expressão de CLV3, esse, por sua vez, reprime a expressão de WUS, reduzindo a ativação de CLV3. Esse é o mecanismo de regulação do meristema, fundamental para a manutenção do número constante de células iniciais (CARLES & FLETCHER, 2003). A expressão de STM é necessária, em adição com WUS, para manter o nível de expressão de CLV3 no meristema. Assim, a iniciação de órgãos na zona periférica do meristema é marcada pela expressão reduzida dos genes KNOX e pela ativação de genes que antagonizam a função do meristema (CASTELLANO & SABLOWSKI, 2005).

Outros genes foram identificados em *A. thaliana* envolvidos no desenvolvimento e manutenção do MAC, dentre eles, CUC1 (CUP SHAPED COTYLEDON 1) e CUC2, expressos no estágio globular de formação do embrião entre dois primórdios de cotilédones, sugerindo serem genes essenciais para a formação do MAC no embrião e na separação dos cotilédones. Para a produção de órgãos, como primórdios foliares na periferia do MAC, a organogênese envolve a mudança do estado determinado à divisão celular para o diferenciado (folhas). Nesse caso, atua o gene ASYMMETRIC LEAVES1 (AS1), sendo que AS1 e AS2 controlam negativamente a expressão de KNOX e são regulados negativamente pelo gene STM (DOERNER, 2003).

Dessa forma, diante do conhecimento que se tem até o momento a respeito de importantes componentes sinalizadores nas plantas, torna-se interessante aprofundar a atuação de alguns deles em um importante e decisivo passo na morfogênese, a divisão celular. Até o momento, sabe-se que os hormônios, os açúcares e nitrogênio são participantes do controle da expressão de elementos-chave do ciclo celular.

II. Objetivo

O presente trabalho teve como objetivo analisar as variações nos teores endógenos de alguns hormônios, açúcares e aminoácidos, os quais estariam, possivelmente, correlacionados com a retomada do ciclo celular nas células em primórdios de gemas axilares de *Ananas comosus* (L.) Merr. Para tanto, foram utilizados segmentos nodais contendo o primórdio gemífero que foram cultivados *in vitro* por um período máximo de 24 horas, após a perda da dominância apical. Analisaram-se os teores endógenos das citocininas Z (*cis e trans*), ZR (*cis e trans*), iP, iPR, iPRMP, iP9G, DHZ, DHZR, DHZRMP e DHZ9G, da auxina AIA e do ABA. Foram dosados também os açúcares solúveis: frutose, glicose e sacarose, além dos aminoácidos livres: alanina, arginina, asparagina, aspartato, fenilalanina, GABA, glicina, glutamato, glutamina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, prolina, serina, treonina, triptofano e valina. Como parâmetro de confirmação da retomada do ciclo celular por células nos primórdios, foram analisados os padrões de expressão de dois genes: uma ciclina do tipo-D (CycD2;1) e uma histona (H2A). Além disso, [H³]timidina foi fornecida aos segmentos nodais visando determinar a fase de replicação do material genético (fase S).

III. Material e Métodos

III.1 Obtenção do material botânico

Para as análises realizadas foram utilizadas plantas de *Ananas comosus* (L.) Merr., var. Smooth Cayenne, cultivadas *in vitro*, provenientes de material clonado existente no Laboratório de Fisiologia Vegetal do Instituto de Biociências / USP.

III.1.1 Estabelecimento do cultivo in vitro

As plantas foram multiplicadas *in vitro* a partir da formação de gemas adventícias ou pela indução do desenvolvimento de primórdios de gemas axilares em meio de cultura líquido denominado de meio de multiplicação. Este foi constituído por ácido α -naftaleno acético (ANA) e 6-benzil-aminopurina (BAP), pelos macronutrientes e micronutrientes minerais de MURASHIGE & SKOOG (1962) (MS), além de tiamina, piridoxina, ácido nicotínico, glicina, mioinositol e sacarose (anexo 1). As culturas foram mantidas sob fotoperíodo de 16 horas de luz, irradiância de 40 µmoles m⁻²s⁻¹ e em temperatura de 25 ± 2 °C.

Após 7 meses de cultura em meio de multiplicação, as plantas formadas foram isoladas da planta-mãe (figura 1A) sendo suas folhas cortadas uniformizando os eixos caulinares em cerca de 1 cm de altura (figura 1B). Em seguida, esses eixos foram transferidos para o meio MS geleificado com a adição de 7 g.L⁻¹ de ágar, sem reguladores de crescimento e mantidos na ausência de luz durante 2 meses para a obtenção de plantas estioladas (1^o estiolamento) (figura 1C). Dessas plantas foram isolados os segmentos nodais (figura 1D), que foram cultivados por 4 meses em meio MS geleificado com a adição de 7 g/L de ágar, sem reguladores de crescimento, sob fotoperíodo de 16 horas de luz, irradiância de 40 µmoles m⁻²s⁻¹ e em temperatura de 25 ± 2 °C, visando à obtenção de plantas homogêneas (figura 1E). Após esse período, as plantas foram transferidas para o meio de multiplicação, no qual foram

mantidas por 20 dias, sob fotoperíodo de 16 horas de luz, irradiância de 40 μ moles m⁻²s⁻¹ e em temperatura de 25 ± 2 °C. Em seguida, as plantas tiveram suas folhas cortadas uniformizando os eixos caulinares em cerca de 1 cm de altura (figura 1F) e foram mantidas na ausência de luz novamente por mais 2 meses para a obtenção de novas plantas estioladas (2º estiolamento) (figura 1G), conforme procedimento citado acima para o 1º estiolamento. A partir dessas plantas estioladas, foram isolados os explantes utilizados para as análises (figura 1H).



Figura 1: Seqüência de estabelecimento do cultivo *in vitro* das plantas. A. Planta cultivada por 7 meses; B. Eixo caulinar com cerca de 1 cm; C. Planta estiolada por 2 meses (1° estiolamento); D. Segmentos nodais isolados; E. Planta cultivada por 4 meses; F. Eixo caulinar com cerca de 1 cm de altura; G. Planta estiolada por 2 meses (2° estiolamento); H. Explantes, a – segmento nodal com o ápice (controle - C); b – segmento nodal decapitado (SND).

III.1.2 Obtenção dos explantes

Para a definição dos explantes adotou-se o conceito de RAVEN *et al.* (2001), que definiram fitômero como uma unidade repetitiva constituída por um nó, a(s) folha(s) localizada(s) nesse nó, o entrenó abaixo e o primórdio de gema axilar contida na base do entrenó (figura 2).



Figura 2: Representação esquemática de um ápice caulinar indicando a presença de quatro fitômeros (unidade repetitiva do vegetal) (modificado de RAVEN *et al.*, 2001).

De acordo com esse modelo, a porção anterior ao 1° nó corresponde à gema apical (ápice) com o meristema apical e os primórdios foliares. O 1° fitômero corresponde ao segmento caulinar que contém o 1° nó com sua folha, o entrenó abaixo e o respectivo primórdio de gema. Os demais fitômeros (2° , 3° , 4° , etc.) são determinados de modo equivalente (figura 2).

Com base no modelo citado acima, obtiveram-se dois tipos de explantes que foram isolados a partir das plantas provenientes do segundo estiolamento: o segmento nodal com ápice (C - controle) (figura 1H-a) e o segmento nodal sem ápice (SND – segmento nodal decapitado) (figura 1H-b). Mais especificamente, os explantes C corresponderam ao segmento caulinar que se estendeu do ápice (gema apical) até a metade superior do 3° fitômero, ou seja, o segmento contendo o ápice e os dois primórdios de gemas axilares logo abaixo deste (figura 3). Os explantes SND corresponderam ao segmento caulinar compreendido entre a metade basal do 2° fitômero até a metade superior do 3° fitômero, ou seja, corresponderam apenas ao segundo primórdio de gema axilar, sentido ápice-base (figura 3).



Figura 3: Esquema indicando as porções caulinares correspondentes aos explantes - controle (C) e aos explantes SND. Os explantes C corresponderam ao segmento caulinar que se estendeu do ápice até a metade superior do 3° fitômero e os explantes SND corresponderam ao segmento caulinar compreendido entre a metade basal do 2° fitômero até a metade superior do 3° fitômero.

Ambos os explantes foram cultivados durante 24 horas em meio MS geleificado com adição de 7 g.L⁻¹ de ágar, sem reguladores de crescimento. O cultivo foi estabelecido sob fotoperíodo de 16 horas de luz, irradiância de radiação de 40 μ moles m⁻²s⁻¹ e em temperatura de 25 ± 2 °C.

III.1.3 Coleta dos explantes

A coleta dos explantes C e SND foi realizada nas primeiras 24 horas de cultivo *in vitro*, realizando-se coletas a cada hora nas primeiras 4 horas, e em seguida a cada 4 horas. Com relação aos explantes C, foram eliminados no momento da coleta o ápice (gema apical), o 1º fitômero e a porção apical do 2º fitômero, isolando-se apenas para análise a região correspondente ao explante SND indicado na figura 3. Os explantes SND foram coletados diretamente.

Imediatamente após o isolamento dos explantes, avaliou-se a massa fresca (MF) e, em seguida, foram congelados em nitrogênio líquido e armazenados em freezer a -70 °C.

III.2 Análise hormonal

Para a análise hormonal foram utilizadas diferentes metodologias de separação dos hormônios, bem como de dosagem. A figura 4 indica as diferentes metodologias utilizadas para cada classe hormonal estudada.





III.2.1 Análise de citocininas (LC/MS-MS)

(citocininas *cisZ*, *transZ*, *cisZR*, *transZR*, iP, iPR, iPRMP, iP9G, DHZ, DHZR, DHZRMP, DHZ9G)

Foi realizada uma análise de 12 tipos de citocininas por LC/MS-MS (cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas) (figura 4). Essa análise foi realizada no Departamento de Biologia da Universiteit Anterwerpen (Bélgica), sob a supervisão da Dra. Els Prinsen. A metodologia utilizada para a análise das citocininas foi baseada no trabalho de PRINSEN *et al.* (1998).

III.2.1.1 Preparo da Sephadex

Anteriormente ao início das extrações foram realizados alguns procedimentos referentes ao preparo de colunas Sephadex, utilizadas para a purificação das citocininas analisadas, como descrito a seguir.

Em um funil preso a um suporte, adicionaram-se cerca de 20 g de DEAE-Sephadex A-25 (Amersham Biosciences[®]) e cerca de 1 L de água destilada. Após o gotejamento em um frasco de vidro foram realizadas 3 lavagens com água destilada e, em seguida, adicionaram-se mais 20 g de DEAE-Sephadex A-25. A solução foi mantida em repouso por 12 horas a 4 °C. Após o repouso adicionou-se cerca de 1 L de amônio-hidrogênio-carbonato a 2 M mantendo a solução a temperatura de 37 °C. Posteriormente, foram adicionados cerca de 2 L de água destilada ou até que o pH atingisse o valor 7.0.

Em seguida, foram preparadas as colunas Sephadex em seringas de 10 mL. Essas foram preenchidas com a solução preparada anteriormente e acopladas em uma outra seringa de 50 mL, conforme esquematizado na figura 5.



Figura 5: Esquema ilustrando a montagem realizada com a coluna Sephadex para a purificação de citocininas.

III.2.1.2 Extração

As amostras (em duplicatas) com cerca de 400 mg matéria fresca foram maceradas em nitrogênio líquido, seguindo-se de uma primeira extração em 1.5 mL de solução de Bieleski (BIELESKI, 1964) composta por 25 % de clorofórmio, 60 % de metanol, 5 % de ácido fórmico e 10 % água destilada. Nesse momento, foram adicionados 10 pmoles de cada um dos 10 padrões internos de citocininas marcadas radioativamente (OlchemIm[®], República Tcheca): dihidrozeatina [${}^{2}H_{5}$]DHZ, dihidrozeatina-N9-ribosídica [${}^{2}H_{5}$][9R]DHZ, dihidrozeatina-N9-glicosídica [${}^{2}H_{5}$][9G]DHZ zeatina [${}^{2}H_{5}$]Z, zeatina ribosídica [${}^{2}H_{5}$][9R]Z, isopenteniladenina [${}^{2}H_{6}$]iP, isopenteniladenosina [${}^{2}H_{6}$][9R]iP, isopenteniladenosina [${}^{2}H_{6}$][9R]iP, e isopenteniladenosina monofosfato [${}^{2}H_{6}$][9R-MP]iP.

As amostras foram agitadas, submetidas ao ultra-som, agitadas novamente e mantidas por 12 horas a temperatura de -20 °C.

Após esse período, uma segunda extração foi realizada, adicionando-se 1 ml de metanol 80 %. As amostras foram agitadas, submetidas ao ultra-som, agitadas novamente e mantidas por 1 hora a temperatura de 4 °C. Seguindo-se à dupla extração, realizou-se uma centrifugação por 15 min, a 16 mil rpm a 4 °C. Posteriormente, o conteúdo das amostras foi transferido para balões de vidro, mantidos no gelo, adicionaram-se 10 mL de água destilada em cada amostra, sendo o pH ajustado para 7.0.

III.2.1.3 Purificação

Foram adicionados 10 mL de água destilada na seqüência de colunas previamente preparadas (figura 5), e após o gotejamento as respectivas colunas DEAE - Shepadex foram acopladas à uma coluna C18 Bond-elut de 500 mg (Varian Inc., USA), previamente ativada com etanol e água destilada (figura 6).



Figura 6: Esquema ilustrando a montagem realizada com as colunas DEAE - Sephadex e C_{18} , para a purificação de citocininas.

A figura 7 representa de modo esquemático e resumido as etapas descritas a seguir.

As amostras foram dispensadas na seqüência de colunas preparadas (figura 6) e o volume foi completado com água destilada para 30 mL. Após o gotejamento, foram adicionados mais 20 mL de água destilada, mantidos também em gotejamento. O objetivo dessa metodologia foi para que as citocininas ligadas à fosfato ficassem aderidas na coluna DEAE-Sephadex (iPRMP e DHZRMP) e as citocininas livres (*cisZ*, *transZ*, *cisZR*, *transZ*, *iP*, *iPR*, *iP9G*, DHZ, DHZR, DHZ9G), ficassem aderidas na coluna C₁₈.

Citocininas ligadas a fosfato (iPRMP, DHZRMP)

O conteúdo da coluna DEAE-Sephadex foi eluído com 10 mL de solução de amoniohidrogênio-carbonato 2 M (mantida previamente a 37 °C para dissolução) e aplicou-se o volume resultante em uma seringa de 50 mL acoplada em uma outra coluna C_{18} ativada previamente com etanol e água destilada. Foram adicionados 40 mL de água destilada para, em seguida, proceder-se ao gotejamento da coluna.

Posteriormente, o conteúdo da C_{18} foi eluído com 8 mL de metanol 80 % em um frasco de vidro, procedendo-se, em seguida, à secagem total em rota-evaporador. Após esse procedimento, as amostras foram adicionadas de 2 mL de tampão TRIS 0.01M pH 9.6 e 10 μ L de fosfatase alcalina (Roche Diagnostics[®], Mannheim, Germany) (1:100 (v:v), fosfatase alcalina: tampão TRIS 0.01 M pH 9.6), sendo assim o frasco mantido em temperatura a 37 °C durante 45 min.

Após essa etapa, foram adicionados 3 mL de tampão PBS com o pH ajustado para 7.0. O conteúdo foi dispensado em colunas de afinidade de anticorpos (OlChemIM[®], República Tcheca, "isoprenoids cytokinin columns") mantidas previamente com tampão PBS, a - 20°C. Em seguida, foram adicionados às colunas de afinidade 5 mL de água ultra-pura. Após o gotejamento, o conteúdo das colunas foi eluído em 3 mL de metanol 100 % em tubos de ensaio previamente silanizados*, procedendo-se à secagem imediata em nitrogênio gasoso (Pierce Reacti-Vap Evaporator / Pierce, Rockford, IL). As amostras foram mantidas a – 20 °C até serem submetidas à dosagem em LC/MS-MS.

Citocininas livres (cisZ, transZ, cisZR, transZR, iP, iPR, iP9G, DHZ, DHZR, DHZ9G)

O conteúdo da coluna C_{18} foi eluído com 8 mL de metanol 80 % em um frasco de vidro, sendo essa fração submetida à secagem em rota-evaporador para a eliminação da porção de metanol presente. Em seguida, foram adicionados 3 mL de tampão PBS, procedendo-se à agitação em ultra-som por 10 seg. O pH das amostras foi ajustado em 7.0.

As amostras foram dispensadas em colunas de afinidade de anticorpos (OlChemIM[®], República Tcheca) mantidas previamente em tampão PBS, a – 20 °C. Em seguida, foram adicionados às colunas de afinidade 5 mL de água ultra-pura. Após o gotejamento, o conteúdo das colunas foi eluído em 3 mL de metanol 100 % em tubos de ensaio previamente silanizados*, procedendo-se à secagem imediata em nitrogênio gasoso (Pierce Reacti-Vap Evaporator / Pierce, Rockford, IL). As amostras foram mantidas a – 20 °C até serem submetidas à dosagem em LC/MS-MS.

* Silanização: os tubos de ensaio foram lavados com hexano, em seguida mantidos por 5 min em solução 5 % de dimethyldiclorosilane, seguindo-se nova lavagem com hexano. Os tubos foram secos a 120 °C por 2 horas para polimerização e então lavados com água destilada por 3 vezes (NETTING & LIDGARD, 1999).



Figura 7: Representação esquemática das etapas de extração e purificação das citocininas analisadas, posteriormente, por LC/MS-MS.

III.2.1.4 Dosagem

As amostras foram ressuspensas em 100 μ L de metanol 100 % e transferidas para frascos de vidro próprios sendo, em seguida, secas em nitrogênio gasoso (Pierce Reacti-Vap Evaporator / Pierce, Rockford, IL). Logo em seguida, foram adicionados 15 μ L de metanol 20 %, procedendo-se a agitação em ultra-som, adição de 45 μ L de água ultra-pura, nova agitação em ultra-som e por último, uma centrifugação de 2 min a 8 mil rpm.

Foram injetados 30 μL de cada amostra em um equipamento LC/MS-MS - ES, um HPLC (cromatografia líquida de alta precisão) acoplado a um Quatro II Mass Spectrometer MS-MS (duplo espectrômetro de massas) (Micromass[®], UK) com uma interface ES "ElectroSpray" (Micromas[®], UK). O equipamento estava com um injetor Kontron 465 e um "loop" de 25 μL.

Para a separação dos compostos citocinínicos utilizou-se uma coluna de fase reversa Synergy 4 μ MAX-RP 80 A, 100 x 1 mm Phenomenex[®]. Os eluentes utilizados foram metanol e acetato de amônio 0.01 M pH 7.0 (20:80, v:v), com fluxo de 60 μ L.min⁻¹. Estabeleceu-se uma seqüência de gradiente dos eluentes em 20 % de metanol por 1 min, 90 % de metanol em 2 min mantendo-se assim por 6.5 min numa fase linear, seguido-se uma redução para metanol 20 % em 10 seg, mantida por 12 min. As condições da corrida foram estabelecidas a uma temperatura da fonte em 80 °C, voltagem do capilar +3.5 kV, voltagem do cone 20 V, energia de colisão 20 eV com gás argônio a pressão de 4.10⁻³ mbar. O equipamento foi acoplado com as bombas Kontron 325 pump (Kontron Instruments[®], Italy).

Foram monitorados íons com uma razão massa/carga (m/z) entre 220 e 136 (Z *cis* e *trans*); 222 e 136 (DHZ) e entre 225 e 136 (e 137) (d-Z e d-DHZ), 352 e 220 (ZR *cis* e *trans*), 354 e 222 (DHZR), 357 e 225 (d-ZR e d-DHZR), 382 e 220 (Z9G), 384 e 222 (DHZ9G), 387

e 225 (d-DHZ9G), 204 e 136 (iP), 210 e 137 (d-iP), 336 e 204 (iPR), 342 e 210 (d-iPR), 366 e 204 (iP9G), 372 e 210 (d-iP9G).

Os dados obtidos em cromatogramas foram processados utilizando-se o programa Masslynx (VG Micromass).

III.2.2 Análise de citocininas (iP, iPR, Z e ZR), AIA e ABA (HPLC - ELISA) Análise de AIA (HPLC - GC-MS-SIM)

Foi realizada uma separação por HPLC de 4 tipos de citocininas (iP, iPR, Z e ZR), AIA e ABA, seguida da dosagem em ELISA (ensaio imunoenzimático) (figura 4). A metodologia utilizada seguiu o método proposto por SOTTA *et al.* (1987), adaptado às condições do Laboratório de Fisiologia Vegetal, do Instituto de Biociências/USP, conforme descrito em PERES *et al.* (1997).

Com relação ao AIA, após a separação em HPLC (juntamente com os hormônios citados acima), também foi realizada a dosagem em GC-MS-SIM (cromatografia a gás seguida de cromatografia de massas e monitoramento seletivo de íons) para efeito de comparação e validação do método ELISA (figura 4).

III.2.2.1 Obtenção e fracionamento dos extratos

Amostras com cerca de 700 mg de MF foram maceradas em nitrogênio líquido, e logo em seguida homogeneizadas com 4 mL de metanol 80 % adicionado de 0.18 mM de butilhidroxi-tolueno (BHT) gelado. Os extratos foram colocados em frascos de vidro envoltos por papel alumínio. Com a finalidade de determinar a taxa de rendimento do processo de extração e das etapas seguintes de purificação e fracionamento do extrato metanólico, foram adicionados a cada amostra 100 μ L de [³H]ABA (2.5 μ Ci de *cis*, *trans* (±)[³H]ABA, Amersham[®]) e 100 μ L de [³H]Z (0.5 μ Ci [³H]Z, Isotope Laboratory[®]).

Com relação ao AIA, durante a extração foram adicionados 550 ng de [${}^{3}C_{6}$]AIA como padrão interno para a dosagem por GC-MS-SIM (cromatografia a gás seguida de cromatografia de massas e monitoramento seletivo de íons). Para a realização de dosagem por ELISA (apenas para as amostras referentes aos tempos de coleta 1 hora, 2, 3 e 4 horas, de ambos os explantes) foram adicionados no momento da extração 100 μ L de [3 H]AIA (0.5 μ Ci de [3 H]AIA, Amersham[®]).

Os extratos foram mantidos sob agitação constante à temperatura de 4 °C durante 60 horas. Em seguida, os extratos foram filtrados em membranas de acetato de celulose (Millipore[®]) de 0.45 μ m e 0.22 μ m de porosidade, passando em seguida, por uma coluna Sep-Pak C-18 (Waters[®]), todas previamente ativadas com metanol 80 % adicionado por BHT.

Após a filtração, os extratos foram secos à vácuo e os resíduos ressupensos em $250 \,\mu\text{L}$ de água ácida em pH 3.0 (água ultra pura adicionada por 0.2 % de ácido fórmico).

Foram injetados 200 μ L das amostras, seguindo-se a separação durante um período de 70 min em um HPLC acoplado a um detector UV (270 nm). Utilizou-se uma coluna de fase reversa C-18 (Waters[®], Prep Nova-Pak HR / 60 A, 6 μ m, 7.8 x 300 mm). Os solventes utilizados foram metanol 80 % adicionado de TEA (ácido trietilamina) e água acidificada com ácido fórmico, pH 3.0. Estabeleceu-se um fluxo de 3 mL.min⁻¹, em um gradiente dos solventes metanol e água acidificada, de 5 % de metanol (0-15 min), 30 % de metanol (16-50 min), 45 % de metanol (51-80 min). Em todos os casos, a água acidificada foi adicionada ao metanol para completar 100 %. As frações foram coletadas em intervalos de 30 seg e depois secas à vacuo em liofizador (Speed Vac Heto[®], CT 100). Após a separação dos hormônios dos extratos vegetais em HPLC, procedeu-se ao preparo das amostras para o ELISA. Para tanto, retirou-se uma alíquota de 100 μ L das frações correspondentes aos hormônios AIA (apenas das amostras destinadas a dosagem por ELISA), Z e ABA, adicionando-se a elas 2 mL de líquido de cintilação (Packard[®], Ultima Gold MV) visando à contagem radioativa por um cintilômetro (Packard[®], TRI CARB 2100 TR). Em seguida, essas frações foram secas em liofilizador (Speed Vac Heto[®], CT 100), ressuspensas em 300 μ L de metanol 100 % e metiladas com 500 μ L de diazometano durante 30 min em um micro-tubo eppendorf[®] fechado, visando otimizar a interação com os anticorpos utilizados na fase seguinte de dosagem hormonal. Posteriormente, essas frações foram secas em nitrogênio gasoso e ressuspensas em 300 μ L de água adicionada por azida sódica (NaN₃) a 2,53 mM, um agente bactericida, para posterior dosagem em ELISA.

Com relação às frações correspondentes aos hormônios iP, iPR e ZR, essas foram igualmente secas, sendo, em seguida, ressuspensas em 400 μ L de água adicionada por NaN₃ a 2,53 mM para posterior dosagem em ELISA.

O rendimento da extração de Z, AIA e ABA foi calculado a partir da contagem radioativa de suas respectivas frações, comparando-se com as contagens radioativas dos padrões radioativos. Para o rendimento de ZR teve-se como base o rendimento do Z, sendo que para iP e iPR, considerou-se o rendimento do ABA.

III.2.2.2 Dosagem

III.2.2.2a Dosagem de citocininas (iP, iPR, Z e ZR), AIA e ABA (ELISA)

Esta dosagem foi realizada utilizando-se como método o imunoensaio ELISA, em placas de poliestireno de imunotitulação (Nunc[®], Maxisorb). O ensaio consiste de três etapas principais: fixação, competição e revelação, descritas em maior detalhe em MERCIER (1993).

Na primeira das etapas (fixação), os hormônios ligados à ovoalbumina (OVA) (AgF, antígeno fixado), AIA-OVA, ABA-OVA, ZR-OVA e iPR-OVA, foram fixados à placa, permanecendo em incubação no escuro a 4 °C por 12 horas. Após lavagem da placa em uma lavadora de Placas ELISA (Laby System[®]) por 5 vezes com "Tween 20" a 0.05 %, adicionouse o antígeno livre (AgL), isto é, a solução hormonal padrão. Essa constituiu-se de 10 diluições conhecidas de cada hormônio (0 fmoles a 100 pmoles), possibilitando, assim, a construção de uma curva-padrão. Posteriormente, adicionaram-se 50 µL das frações correspondentes ao iP, iPR, Z, ZR, AIA e ABA (item III.2.2.1) nas placas correspondentes para cada hormônio.

Numa fase seguinte, iniciou-se a competição ao se depositar o anticorpo correspondente a cada hormônio, ou seja, o anticorpo primário (AC1), incubando-se a placa no escuro a 4 °C por 2 horas. Nessa fase, o AC1 reagiu com o AgF e com o AgL. Após nova lavagem da placa com "Tween 20" a 0.05 % para a eliminação dos complexos AC1/AgL e AC1/AgF, depositou-se um segundo anticorpo (AC2), ligado à peroxidase, cuja incubação da placa ocorreu a 40 °C por 1 hora.

Na etapa de revelação, após nova lavagem da placa com "Tween 20" a 0.05 %, depositou-se o substrato da enzima peroxidase, o ABTS (2,2'-azino-bis(3-etilbenziltiazolina-6-ácido sulfônico), incubando-se a placa a 40 °C por 45 min. Nessa etapa, a solução se coloriu em função da transformação do ABTS pela peroxidase. Após esse período, foi feita a leitura da D.O.(densidade óptica) num leitor apropriado para placas de imunotitulação (Thermo Labystems[®] Multiskan EX) com um filtro de 405 nm.

Nas placas, foram realizadas 4 repetições para cada amostra calculando-se o desvio padrão. Os cálculos foram feitos de acordo com uma curva de calibração, utilizando uma regressão polinomial de 4^a ordem obtida a partir de quatro curvas-padrão experimentais. Levou-se em conta os valores de D.O. obtidos para cada amostra comparando-os com aqueles da curva-padrão. O rendimento da extração, a massa fresca inicial das amostras e o fator de diluição dos extratos também foram levados em consideração. Teve-se como referência os valores de média da curva-padrão dos hormônios para a determinação das concentrações hormonais endógenas presentes nos explantes.

III.2.2.2b Dosagem de AIA (GC-MS-SIM)

Essa análise foi realizada sob a supervisão do Prof. Dr. Eduardo Purgatto, no Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (USP), seguindo a metodologia descrita por CHEN *et al.* (1988) e adaptada por PURGATTO (2001).

As frações correspondentes ao AIA separadas por HPLC (item III.2.2.1) foram secas em liofilizador (Speed Vac Heto[®], CT 100) e em seguida ressuspensas em 300 μ L de metanol 100 % e metiladas com 500 μ L de diazometano durante 30 min em um micro-tubo eppendorf[®] fechado e, em seguida, secas em nitrogênio gasoso. Os extratos metilados foram ressuspensos em 50 μ L de acetato de etila para então serem analisadas em um GC-MS-SIM, um cromatógrafo a gás (GC) (Hewlett-Pakard[®] 6890), conectado a um espectômetro de massas (MS) (modelo 5973) seguido por um monitoramento seletivo de íons (SIM). Foi utilizada uma coluna de separação HP-1701 (30 m, D.I. 0.25 mm, 0.5 μ m de espessura do filtro interno), sendo hélio o gás condutor num fluxo de 4 mL.min⁻¹. O volume injetado de cada amostra foi de 5 μ L. Foram monitorados os íons com uma razão massa/carga (m/z) entre 130 e 136 (AIA endógeno) e entre 136 e 195 (padrão interno). A concentração endógena de AIA foi obtida comparando-se as áreas dos picos do cromatograma extraídos em m/z de 130-136 e 136-195.

III. 3 Análise de açúcares solúveis

Essa análise foi realizada no Instituto de Botânica (IBt/SP), sob a supervisão do Prof. Dr. Marcos S. Buckeridge (IB/USP).

III.3.1 Extração, dosagem e qualificação dos carboidratos endógenos

Amostras com cerca de 300 mg de MF foram homogeneizadas em etanol 80 % gelado, utilizando-se um triturador/homogeneizador (Kinematica Polytron[®] PT 10-35), e submetidas em seguida à uma extração tripla por fervura em etanol 80 % durante 5 min cada uma. O sobrenadante resultante foi coletado e o precipitado submetido a duas novas extrações, segundo o método de MCCREADY *et al.* (1950). Os extratos foram centrifugados a 10 mil g, durante 10 min a 4 °C e filtrados em microfibra de vidro Whatman[®]. Da combinação dos três extratos alcoólicos obteve-se o sobrenadante, correspondente à fração de açúcares solúveis, cujo volume final foi ajustado com etanol 80 %.

Utilizando-se o sobrenadante, foi realizada uma quantificação de açúcares totais através de dosagem colorimétrica com o método fenol-sulfúrico (DUBOIS *et al.*, 1956) para o cálculo de possíveis perdas ocorridas durante as etapas descritas acima. Todas as dosagens foram realizadas simultaneamente, em triplicata, e os resultados expressos em média dos valores obtidos, em equivalentes de glicose. O resíduo foi guardado em freezer -20 °C para posterior extração e dosagem do amido (ver item III.4).

Após essa quantificação, os extratos foram concentrados em rota-evaporador até a secura, em temperatura não superior a 40 °C, evitando-se assim a caramelização dos açúcares. Na seqüência, as amostras foram ressuspensas em 2 mL de água destilada. Posteriormente, procedeu-se à eliminação de cátions e ânions contidos nas amostras, cujas presenças implicariam em interferências deletérias à detecção dos açúcares solúveis. Esse procedimento foi realizado em colunas de troca iônica de resina catiônica Dowex[®] 50 x 8-200 na forma de NA⁺ e resina aniônica Dowex[®] 1 x 8-200 na forma de CI⁻. Os açúcares neutros foram filtrados em filtros Millex HV[®] de 0.45 μ m. Foram então eluídos em 10 volumes de água destilada (POLLOCK & JONES, 1979) e liofilizados até a secura, sendo posteriormente ressuspensos em 1 mL de água deionizada. As amostras assim concentradas foram novamente quantificadas pelo método fenol-sulfúrico e alíquotas de 5 μ L analisadas através de uma coluna de troca aniônica CarboPak[®] PA-1 de 4 x 250 mm (Dionex Corporation[®]), em um sistema de cromatografia líquida de alta resolução de troca aniônica (HPAEC), acoplado a um detector de pulsos amperométricos (PAD/Dionex[®]). Foi utilizado um gradiente de hidróxido de sódio (NaOH) a 200 mM e água durante 20 min.

As respostas do detector obtidas na análise das amostras foram comparadas com padrões de glicose, frutose e sacarose nas concentrações de 25, 50, 75, 100, 150 e 200 μ M. Uma curva padrão foi assim estabelecida para cada açúcar no cálculo do conteúdo de carboidratos nas amostras. O método para a qualificação e quantificação da glicose, frutose e sacarose foi baseado no trabalho de STANCATO *et al.* (2001).

III.4 Análise de amido

Para as análises de amido, seguiu-se metodologia proposta por AMARAL (2005). Foram utilizados cerca de 40 mg do extrato de cada explante obtido no item III.3.1. A seguir, foram adicionados 500 μ L (120 U.mL⁻¹) de α -amilase termoestável do *Bacillus licheniformis* (Megazyme[®]) diluídos em tampão MOPS 10 mM pH 6.5. As amostras foram incubadas a 75 ^oC por 30 min. Esse procedimento foi repetido mais uma vez, totalizando 1.0 mL de enzima. Após resfriamento até 50 °C, adicionaram-se 500 µL de solução contendo amiloglucosidase (AMG) (15 U.mL⁻¹) do fungo Aspergillus niger (Megazyme[®]) em tampão acetato de sódio 100 mM pH 4.5 e as amostras foram incubadas a 50 °C por 30 min. Este procedimento foi repetido mais uma vez, totalizando 2.0 mL de enzima. Após quatro incubações, foram acrescentados 100 µL de ácido perclórico 0.8 M, objetivando estacionar a reação e precipitar as proteínas. Após uma rápida centrifugação por 2 min a 12 mil rpm, procedeu-se à dosagem do amido, utilizando-se alíquotas de 40 µL de extrato, às quais foram adicionadas 260 µL das enzimas glicose oxidase e peroxidase, bem como os reagentes 4-aminoantipirina e fenol (GODPOD - Glicose PAP Liquiform/Centerlab[®]). Após incubação por 30 min a 30 °C, o teor de glicose foi determinado em um leitor de placas de ELISA (Thermo Labystems[®] Multiskan EX), utilizando-se comprimento de onda a 490 nm. A curva padrão foi realizada utilizando-se solução de glicose (Sigma[®]), nas concentrações de 0, 2.5, 5,10 e 20 µg.

III.5 Análise de aminoácidos livres

III.5.1 Extração de aminoácidos livres totais

Triplicatas com cerca de 200 mg de MF foram maceradas utilizando-se um triturador/homogeneizador (Kinematica Polytron[®] PT10-35) em 6 mL de MCA (metanol: clorofórmio: água, 12:5:3, v/v/v) (HORTA & SODEK, 1997). O padrão interno nor-leucina na concentração de 500 nmol foi adicionado no momento da homogeneização (700 µL por amostra). O extrato resultante ficou sob agitação durante 24 horas na câmara fria a 4 °C e após esse período, foi submetido a uma centrifugação de 2 mil rpm, durante 6 min a 4 °C. O sobrenadante foi coletado e o precipitado foi novamente ressuspenso em 2 mL de MCA, sendo submetido a uma nova centrifugação por 6 min. Os sobrenadantes foram combinados e transferidos para um funil de separação de 50 mL. Ao funil de separação foram acrescidos 4 mL de clorofórmio e 2 mL de água ultrapurificada. Esse extrato foi agitado e colocado em repouso até a separação total das fases aquosa e clorofórmica (cerca de 2 a 3 horas). Após a separação, a fase aquosa foi coletada em tubos de ensaio e concentrada em liofilizador (Speed vac Heto[®], CT 110) até a secagem total, sendo, em seguida ressuspensa em 1 mL de água ultrapurificada. Os extratos assim obtidos foram utilizados nas quantificações posteriores dos aminoácidos.

III.5.2 Quantificação de aminoácidos livres totais

Para a quantificação dos aminoácidos livres em HPLC foi necessário quantificar previamente os aminoácidos totais para se coletar uma quantidade de aminoácidos exata da amostra a ser derivatizada. Para tanto, utilizou-se o método da ninidrina (MOORE & STEIN, 1954) na análise de aminoácidos totais, tendo a leucina como padrão interno. Em tubos de ensaio contendo 50 µL do extrato vegetal obtido, foram adicionados 1,5 mL de tampão citrato 0.2 M pH 5.0 em e 1.2 mL do reagente contendo ninidrina. Esse último foi preparado misturando-se duas soluções: 2.5 g de ninidrina dissolvidos em metil celossolve até completar o volume de 50 mL e uma outra solução contendo 5 mL de KCN 0.01 M, acrescido de metil celossolve, até completar o volume de 250 mL.

Os tubos de ensaio foram agitados, fechados com papel alumínio e aquecidos em um termo-banho a 100 °C por 15 min. Em seguida, esses foram resfriados em água corrente durante 5 min, para então serem adicionados de 3 mL de etanol 60 %. A absorbância foi determinada num espectrofotômetro em comprimento de onda de 570 nm.

A curva-padrão foi obtida a partir de soluções de diferentes concentrações de leucina (0 a 0.5 mM). A quantidade de aminoácidos livres foi expressa em mM de leucina por g de massa fresca.

III.5.3 Fracionamento e dosagem dos aminoácidos livres

Após a quantificação dos aminoácidos totais descrita acima, um volume contendo 0.05 μ M de aminoácidos totais de cada amostra foram concentradas em liofilizador (Speed vac Heto[®], CT 110) até a secagem total. Ao resíduo foram acrescidos 10 μ L de uma solução preparada na proporção de 20 μ L de metanol: 20 μ L de acetato de sódio 1 M : 10 μ L de TEA. Essa solução foi concentrada em liofilizador e após a secagem total foram adicionados ao resíduo 20 μ L de uma solução com fenilisotiocianeto preparada na proporção de 70 μ L de metanol : 10 μ L de trietilamina : 10 μ L de água ultrafiltrada : 10 μ L de fenilisotiocianeto, formando o feniltiocarbamil-aminoácido, processo denominado de derivatização (GUITART *et al.*, 1991; BAKER *et al.*, 1997).
O padrão utilizado para a identificação e a determinação da quantidade relativa dos aminoácidos foi o S18 (Sigma[®]), acrescido dos aminoácidos asparagina, triptofano, glutamina, norleucina, ácido δ-aminobutírico (GABA), taurina, citrulina e ornitina. Dessa solução, 5 nmoles foram concentrados em liofilizador (Speed Vac Heto[®] CT 110) até a secagem total, sendo derivatizados como já descrito para as amostras.

As amostras e o padrão foram ressuspensos em 100 μ L do eluente "Pico-Tag sample diluent" (Waters[®]) em 710 mg.L⁻¹ de fosfato de hidrogênio dissódio, cujo pH foi ajustado em 7.4 com ácido fosfórico 10 %. À solução resultante foram acrescidos 5 % de acetonitrila e posteriormente 10 μ L foram injetados para a separação dos aminoácidos em um HPLC acoplado a um detector UV (254 nm). Foi utilizada uma coluna Pico-Tag Waters[®] (3,9 x 300 mm) a 38 °C em um gradiente formado pela mistura de duas fases móveis: tampão acetato (940 mL de tampão acetato de sódio + 0.5 mL de trietilamina + 60 mL de acetonitrila) e acetonitrila : água (600 mL de acetonitrila + 400 mL de água ultrapurificada) (fase orgânica). O fluxo foi fixado em 1 mL.min⁻¹ e a temperatura da coluna em 38 °C. Os aminoácidos derivatizados foram eluídos gradativamente com o aumento da proporção da fase orgânica.

A concentração de cada aminoácido nas amostras foi calculada pela comparação entre a área do aminoácido a ser dosado e a área do padrão de concentração conhecida. O volume de injeção no cromatógrafo de cada amostra e do padrão foi sempre de 10 µL.

A técnica descrita acima detectou 16 aminoácidos nos explantes estudados: aspartato (Asp), glutamato (Glu), asparagina (Asn), glutamina (Gln), histidina (His), ácido δ-aminobutírico (GABA), arginina (Arg), alanina (Ala), prolina (Pro), valina (Val), metionina (Met), isoleucina (Ile), leucina (Leu), fenilalanina (Phe), triptofano (Trp) e lisina (Lys).

III.6 Análise molecular

Essa análise foi realizada no Laboratório de Melhoramento de Plantas (CENA/Piracicaba), sob a supervisão do Prof. Dr. Antonio Figueira e da Dra. Jeanne B. M. Machado (PRODOC – CAPES).

III.6.1 Análise da expressão dos genes CycD2;1 e H2A em RT – qPCR

III.6.1.1 Obtenção dos oligonucleotídeos

Para o estudo molecular foram primeiramente desenhados oligonucleotídeos específicos para os genes de interesse a partir de seqüências de nucleotídeos de uma biblioteca de cDNA de abacaxizeiro, disponível no "GenBank" localizado no "site" http://www.ncbi.nlm.nih.gov.

Foram obtidas 4 seqüências de nucleotídeos, uma ciclina do tipo-D (CycD2;1 – accession number DT336393) e uma histona (H2A – acession number DT339406) destinadas ao estudo do processo de divisão celular e mais duas seqüências utilizadas para genes de expressão constitutiva (genes de referência), ribossomal (Rib 18S – acession number D29786) e gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH, acession number DV190714).

Utilizou-se um programa específico para o desenho dos oligonucleotídeos - Primer3, disponível no "site" <u>http://fokker.wi.mit.edu/primer3/</u> (ROZEN & SKALETSKY, 2000) e um programa específico para verificação da estabilidade dos oligonucleotídeos, NetPrimer, disponível no "site":

http://www.premierbiosoft.com/netprimer/netprlaunch/netprlaunch.html.

Os oligonucleotídeos desenhados estão listados na tabela 1.

Gene	Oligonucleotídeos	Tamanho do fragmento	
CycD2;1	senso:		
	atgcgtgggtctccttgtt	114 pb	
	anti - senso:		
	caatcaatggcgtctcgtct		
H2A	senso:		
	ggcagaggtattggaactgg	169 pb	
	anti - senso:		
	aatgaggacttgtggatgtg		
Rib 18S	senso:		
	aaacggctaccacatccaag	251 pb	
	anti-senso:		
	gacacaacccaaggtccaa		
GAPDH	senso:		
	tgcccctatgtttgttgttg	219 pb	
	anti -senso:		
	cgtccacctctccagtcctt		

Tabela 1: Seqüência dos oligonucleotídeos utilizados e o tamanho do fragmento amplificado

Os oligonucleotídeos foram diluídos em água ultrapurificada, sendo o estoque diluído a 100 pmoles. μ L⁻¹ e a solução de uso, diluída a 10 pmoles. μ L⁻¹.

III.6.1.2 Extração de RNA total

A extração do RNA total foi realizada em duplicatas com cerca de 600 mg de MF de cada amostra seguindo as especificações do fabricante de Trizol (Invitrogen[®]). Para o procedimento de extração do RNA, bem como para as etapas que se seguiram, foram tomados os devidos cuidados à manutenção da integridade do mesmo. Para tanto, todos os utensílios utilizados foram previamente tratados com água ultrapurificada adicionada de

dietilpirocarbonato (DEPC) a 0.01 % e submetidos à esterilização em autoclave por 40 min a 120 °C e1 atm de pressão.

Cada amostra foi macerada em nitrogênio líquido com a adição de um antioxidante no momento da maceração, o polivinilpirrolidona (PVPP) a 5 %. Ao macerado foi adicionado 1 mL de Trizol (Invitrogen[®]), submetendo-se à agitação em vórtex por 30 seg. Após 5 min de incubação a temperatura ambiente, foram adicionados 200 μ L de clorofórmio, seguindo-se de agitação em vórtex por 30 seg e a uma centrifugação por 10 min, a 12 mil rpm e a 4 °C. Foram coletados 600 μ L do sobrenadante, aos quais foram adicionados 500 μ L de isopropanol. Após uma mistura manual por inversão, as amostras foram submetidas a uma precipitação a – 20 °C por 2 horas. Seguiu-se uma centrifugação nas mesmas condições, sendo o sobrenadante descartado cuidadosamente e adicionando-se ao precipitado 1 mL de etanol 75 % gelado preparado com água ultrapurificada esterilizada tratada com DEPC a 0.01 %, passando por nova agitação e centrifugação nas condições anteriores. O sobrenadante foi descartado e as amostras foram mantidas em temperatura ambiente até a secagem total para, então, serem ressuspensas em 20 μ L de água ultrapurificada esterilizada tratada com DEPC a 0.01 % e mantidas em freezer a - 70 °C até o procedimento das etapas seguintes.

III.6.1.3 Quantificação do RNA total

A integridade do RNA total extraído foi confirmada por eletroforese em gel de agarose a 1.5 % em tampão SB 1x (BRODY & KERN, 2004), aplicando-se uma alíquota de 2 μ L do RNA total extraído de cada amostra.

Com o objetivo de determinar a concentração e pureza do RNA total extraído, uma outra alíquota de 2 µL foi retirada para leitura da densidade óptica em um espectrofotômetro (Smarspech 3000, BioRad[®]) em absorbância de 260 nm, à razão de 260/280 nm.

III.6.1.4 Tratamento com DNAase

Após a quantificação do RNA total extraído, cerca de 2 μ g foram submetidos a tratamento com DNAase I (Fermentas Life Science[®]). Para tanto, seguiu-se as especificações do fabricante, utilizando-se 1 μ L de DNAase I, 1 μ L de RNAase "out" (Invitrogen[®]), 1 μ L de tampão da DNAase, para um volume final da reação de 10 μ L. O tubo foi incubado em um termociclador Perkin-Elmer 9700 nas seguintes condições: 37 ^oC por 30 min, 25 ^oC por 2 min (nesse momento foi adicionado 1 μ L de EDTA), seguindo-se 65 ^oC por 10 min e 4 ^oC, para a inativação da enzima.

III.6.1.5 Síntese de cDNA

Primeiramente, foi realizado um teste com o RNA tratado com DNAase para garantir que o tratamento com a enzima foi eficiente, ou seja, que só houvesse a amplificação dos oligonucleotídeos no cDNA e não em algum segmento de DNA, resultado de uma possível contaminação durante a extração do RNA total das amostras.

Em seguida, foi realizada a síntese da primeira fita do cDNA utilizando-se cerca de 1 μ g do RNA total tratado seguindo as especificações do Kit para síntese de cDNA (Promega[®]). Para tanto, foram utilizados 5.5 μ L do RNA total tratado, 1 μ L de "random primer", 4 μ L do tampão Impront II 5X buffer, 2.4 μ L de MgCl₂ 25 mM, 1 μ L de dNTP "mix" 10 mM, 1 μ L de RNAase "out" (Invitrogen[®]), 1 μ L da enzima Impront Thermo Script (Promega[®]) e 4.1 μ L de água ultrapurificada esterilizada tratada com DEPC a 0.01 %, num volume final da reação de 20 μ L.

A reação de transcrição reversa foi realizada em um termociclador Perkin-Elmer 9700 nas seguintes condições: 65 °C por 5 min, 25 °C por 5 min, 42 °C por 60 min, 70 °C por 15 min e 4 °C. Com o objetivo de certificar a especificidade dos fragmentos obtidos a serem utilizados nas análises em Real Time-qPCR, foi realizada uma amplificação de cada fragmento em uma reação de PCR utilizando um termociclador Perkin-Elmer 9700 visando a purificação e o sequenciamento.

O volume total da PCR foi de 50 μ L, adicionando-se 2 μ L de cada dNTP a 10 mM para uma concentração final de 200 μ M, 3 μ L de MgCl₂ a 50 mM para uma concentração final de 3 mM, 1 unidade/ μ L de Taq DNA polimerase (Platinum), 5 μ L de tampão Tris-HCl a 1mM de, 10 μ L de cada oligonucleotídeo a 10 pmoles. μ L⁻¹ e 1 μ L do cDNA da amostra referente ao tempo de coleta 24 horas SND. A reação de PCR foi estabelecida nas seguintes condições: 40 ciclos de 94 °C por 3 min, 94 °C por 30 seg, 60°C por 30 seg, 72 °C por 30 seg, seguindo-se de uma extensão por 7 min a 72 °C para os oligonucleotídeos Rib 18 S e CycD2;1. Para os oligonucleotídeos H2A e GAPDH utilizou-se a condição: 40 ciclos de 94 °C por 30 seg, 62°C por 30 seg, 72 °C por 30 seg, seguindo-se de uma extensão por 7 min a 72 °C por 30 seg, seguindo-se de uma extensão por 7 min a 72 °C por 30 seg, 94 °C por 30 seg, 62°C por 30 seg, 72 °C por 30 seg, seguindo-se de uma extensão por 7 min a 72 °C por 30 seg, seguindo-se de uma extensão por 7 min a 72 °C por 30 seg, 94 °C por 30 seg, 62°C por 30 seg, 72 °C por 30 seg, seguindo-se de uma extensão por 7 min a 72 °C por 30 seg, 72 °C por 30 seg, 94 °C por 30 seg, 62°C por 30 seg, 72 °C por 30 seg, seguindo-se de uma

III.6.1.6 Sequenciamento dos fragmentos amplificados por PCR

Foram utilizados 45 μ L do produto da reação de PCR realizada no item anterior para serem fracionados por eletroforese a 100 volts em gel de agarose 1.5 % em tampão SB 1x (BRODY & KERN, 2004). O gel foi corado com brometo de etídeo (5 μ g.mL⁻¹), visualizado por iluminação UV (302 nm) e fotografado em aparelho de fotodocumentação.

Após a separação no gel, as bandas obtidas de cada gene amplificado foram isoladas com o auxílio de um bisturi esterelizado para posterior purificação.

Para a purificação das bandas obtidas seguiu-se as orientações do Kit Amersham Biosciences GFXTM PCR DNA and Gel Band purification Kit. Para a verificação da integridade dos produtos purificados, os mesmos foram submetido à eletroforese a 100 volts em gel de agarose 1.5 % em tampão SB 1x (BRODY & KERN, 2004). O gel foi corado com brometo de etídeo (5 μ g.mL⁻¹) e visualizado por iluminação UV (302 nm).

Em seguida, procedeu-se à reação de sequenciamento, seguindo as especificações do Kit Dyenamic Terminator – Amersham[®] ABI – 3100 em um aparelho de sequenciamento modelo ABI3100 (Apllayed Biosystem[®]), gentilmente fornecido pela Profa. Dra. Sui Mui Tsai (CENA, Piracicaba).

As seqüências obtidas (anexo 2) foram analisadas no programa BLAST(n), disponível no "site" <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov</u>, para confirmação da seqüência dos genes de interesse.

III.6.1.7 Análise em Real – Time qPCR (RT-qPCR)

As análises de RT-qPCR (PCR quantitativa em tempo real) foram realizadas em um termociclador centrífugo Rotor Gene 3000, Corbett Research[®] a partir de diluições do cDNA total derivado da transcrição reversa das amostras de RNA tratadas com DNAase (item III.6.1.5). Para os oligonucleotídeos CycD2;1 e H2A foi utilizada uma diluição do cDNA das amostras de 1:10 e para Rib 18S e GAPDH foi utilizada uma diluição de 1:100, sendo que de cada amostra (em duplicatas de extração, ver item III.6.1.2) foram obtidas triplicatas para as análises.

As reações de amplificação foram realizadas em um volume final de 10 μ L, utilizando-se 2 μ L de cDNA nas diluição citadas acima, 1 μ L de cada oligonucleotídeo (senso e anti-senso) a 10 pmoles. μ L⁻¹, 5 μ L de Platinum SYBR-green qPCR SuperMix-UDG 2X (Invitrogen[®]) e 1 μ L de água ultrapurificada esterilizada.

Inicialmente, foi realizada uma curva de eficiência de amplificação para cada oligonucleotídeo (anexo 3). A curva de eficiência foi determinada em uma curva padrão com uma diluição serial do cDNA de uma amostra aleatória a 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-4} (sendo que, para o Rib 18S, foi incluída uma diluição a 10^{-6}) pelo coeficiente R² resultante no valor mais próximo possível de 0.99 como sendo ideal e eficiência (E) ideal no valor em torno de 2.

A amplificação foi conduzida em incubações iniciais a 50 °C por 2 min, 95 °C por 2 min e seguidas de 40 ciclos de 95 °C por 15 seg e 60 °C (para os iniciadores CycD2;1 e Rib 18S) ou 62 °C (para os iniciadores H2A e GAPDH) por 30 seg, com detecção do sinal da fluorescência ao final de cada etapa de extensão. Após a termociclagem, uma curva de desnaturação foi obtida entre 72 °C e 95 °C, determinando as curvas de dissociação de cada produto amplificado.

Baseando-se na metodologia descrita por PFAFFL (2001), cada corrida no termociclador incluiu 2 repetições de cada amostra para um oligonucleotídeo e 1 repetição de cada amostra para um outro oligonucleotídeo (alternadamente em cada corrida: oligonucleotídeo de referência e oligonucleotídeo-alvo do estudo). Em cada corrida foram incluídas 3 repetições de um controle negativo (somente a reação de PCR em água, sem DNA molde).

A aquisição dos dados foi efetuada utilizando o programa Rotor Gene Real-Time Analysis 6.0, Corbett Research[®], o qual forneceu os valores de ciclo-limite de leitura (CT), eficiência da PCR (E) e R², sendo que definiu-se o valor de 0.1 para o "threshold" (piso de fluorescência) de cada corrida.

Os valores quantitativos de expressão para cada amostra foram determinados usando um modelo similar ao de PFAFFL (2001), considerando como referência os transcritos relacionados aos genes de referência GAPDH e ao Rib 18S. O modelo utilizado consistiu na determinação do valor de expressão calculado da seguinte forma: de cada oligonucleotídeo foi obtida a média dos valores de CTs. Em seguida, desse valor foi subtraído o valor da média de CT do controle utilizado (tempo zero hora, que equivaleu à coleta do segmento nodal contendo o primórdio gemífero, representado pelo explante SND, na planta-mãe). Os valores foram elevados aos valores da eficiência (E) do oligonucleotídeo analisado, e por último, foram determinadas as razões entre os valores de expressão obtidos do gene de interesse (CycD2;1 e H2A) em relação aos valores de expressão dos genes de referência (GAPDH e Rib 18S), ou seja, CycD2;1/GAPDH, CycD2;1/Rib 18S, H2A/GAPDH e H2A/ Rib 18S.

Para se estabelecer o gene de referência ideal nas amostras analisadas, utilizou-se o programa BestKeeper (PFAFFL *et al.*, 2004), disponível no "site" <u>http://www.gene-</u> <u>quantification.de/bestkeeper.html</u>, o qual indicou o Rib 18S como sendo o gene constitutivo de menor variação de expressão durante o processo estudado.

III.6.2 Análise do conteúdo de DNA

III.6.2.1 Extração de DNA

Procedeu-se à extração do DNA genômico segundo a metodologia descrita por FULTON *et al.* (1995). Amostras com cerca de 600 mg de MF foram maceradas em nitrogênio líquido em 2 mL de tampão de homogeneização (Tris-HCl 0.2 M pH 8.0, EDTA 0.05 M pH 8.8, NaCl 2.2 M, CTAB (brometo de hexadeciltrimetilamônio) 0.02 % e água ultrapurificada) adicionando-se o antioxidante PVP (polivinilpirrolidona) a 0.5 g/g MF no momento da maceração. Ao macerado foram adicionados 2 mL de CTAB 20 %, 2 mL de PVP 10 % e 2 mL de N-lauryl-sarcosine 10 %. As amostras foram agitadas por inversão e em seguida incubadas por 1 hora a 65 °C.

Após a incubação, foram adicionados 8 mL de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1, v:v:v) e após homogeneização o material foi submetido à centrifugação a 12 mil rpm, por 10 min, a 4°C. Da fase aquosa formada foram retiradas duplicatas de 700 μ L, às quais foram adicionados 8 mL de isopropanol gelado e 2 mL de NaCl 5 M. O material foi mantido a – 20 °C por 24 horas para a precipitação do DNA.

Após a precipitação, as amostras foram novamente centrifugadas a 12 mil rpm por 15 min, a 4°C descartando-se, em seguida, o sobrenadante. Ao precipitado foi adicionado 1 mL de etanol 70 % gelado preparado com água ultrapurificada esterilizada adicionada por DEPC a 0.01 %, seguindo-se um nova centrifugação nas condições anteriores, descartando-se em seguida o sobrenadante. O precipitado foi submetido à secagem e posteriormente ressuspenso em 50 μ L de Tris – EDTA e incubado a 37 °C por cerca de 2 horas para então, ser armazenado em freezer a – 20 °C.

III.6.2.2 Tratamento com RNAase

O DNA genômico extraído de cada amostra foi tratado com 2.5 μ L de RNAase (Amersham Bioscience[®]) a 10 mg.mL⁻¹, mantendo-se a reação em incubação a 37 °C por 1 hora.

III.6.2.3 Quantificação do DNA genômico

III.6.2.3a Método por fluorimetria

Foi realizada a quantificação do DNA genômico, utilizando-se uma alíquota de $10 \,\mu\text{L}$ do DNA tratado (item III.6.2.2), adicionando-se o corante H33258 (Hoescht[®]) para leitura da densidade óptica em um fluorímetro (DyNA Quant 200 Bio Rad[®]) em absorbância de 280 nm.

III.6.2.3b Método por RT-qPCR

A análise do conteúdo de DNA das amostras foi realizada de acordo com a metodologia proposta por WILHELM *et al.* (2003), utilizando-se um termociclador centrífugo Rotor Gene 3000, Corbett Research[®]. Partiu-se para a análise, o DNA extraído de cada amostra tratado com RNAase, utilizado o oligonucleotídeo Rib 18S (item III.6.1.1) como gene para a quantificação absoluta.

As reações de amplificação foram realizadas em um volume final de 10 μ L, utilizando-se 2 μ L de DNA tratado com RNAase, 1 μ L do oligonucleotídeo (senso e antisenso) a 10 pmoles/ μ L, 5 μ L de Platinum SYBR-green qPCR SuperMix-UDG 2X (Invitrogen[®]) e 1 μ L de água ultrapurificada esterilizada.

Uma curva de eficiência foi determinada estabelecendo-se como controle positivo (calibrador) o produto da amplificação com o oligonucleotídeo Rib 18S (senso e antisenso) a partir do cDNA da amostra 16 horas SND. O material purificado e quantificado da amostra de cDNA foi diluído a 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵, 10⁻⁶, 10⁻⁷ e 10⁻⁸. Utilizou-se o coeficiente R² resultante no valor o mais próximo possível de 0.99 como sendo ideal e eficiência (E) ideal no valor em torno de 2.

A amplificação foi conduzida em incubações iniciais a 50 °C por 2 min, 95 °C por 2 min, seguindo-se 40 ciclos de 95 °C por 15 seg e 60 °C por 30 seg, com detecção do sinal da fluorescência ao final de cada etapa de extensão. Após a termociclagem, uma curva de desnaturação foi obtida entre 72 °C e 95 °C, determinando a curva de dissociação do produto amplificado.

A corrida no termociclador incluiu 2 repetições de cada amostra e do controle negativo (somente a reação de PCR em água, sem DNA molde).

A aquisição dos dados foi efetuada utilizando-se o programa Rotor Gene Real-Time Analysis 6.0, Corbett Research[®], o qual forneceu os valores de ciclo-limite de leitura (CT), eficiência da PCR (E) e R², sendo que definiu-se o valor de 0.1 para o "threshold" (piso de fluorescência) de cada corrida.

Os valores quantitativos de expressão para cada amostra foram determinados usando o modelo proposto por WILHELM *et al.* (2003).

III.6.3 Obtenção de um cDNA parcial codificando para a proteína ciclina B (CycB1;2) através do uso de oligonucleotídeos degenerados

Além dos oligonucleotídeos específicos para abacaxizeiro, objetivou-se estudar o gene de uma ciclina do tipo-B, CycB1;2, entretanto, não disponível na biblioteca de cDNA de abacaxizeiro, da qual foram obtidos os oligonucleotídeos GAPDH, Rib 18S, H2A e CycD2;1. Foi realizado um alimento de seqüências de proteínas obtidas de CycB1;2 de arroz, cana-deaçúcar, cevada, cebola, milho e trigo utilizando-se o programa CLUSTALW, disponível no "site" <u>http://www.clustalw.genome.ad.jp</u>. Foi escolhida a região de maior homologia entre as seqüências, com aproximadamente 8 aminoácidos, e a seguir os nucleotídeos foram degenerados, obtendo-se:

senso (26 pb): gAY.Tgg.WTARTM.gAR.gTS.CAH.HMY.AR anti senso (23 pb): CYR.SAY.YCW.gCN.gYR.TAS.ACW.gA

Primeiramente, procedeu-se a amplificação do oligonucleotídeo em uma reação de PCR utilizando um termociclador Perkin-Elmer 9700.

O volume total da PCR foi de 50 μ L, adicionando-se 2 μ L de cada dNTP a 10 mM para uma concentração final de 200 μ M, 3 μ L de MgCl₂ a 50 mM para uma concentração final de 3 mM, 1 unidade/ μ L de Taq DNA polimerase (Platinum), 5 μ L de tampão Tris-HCl a 1mM de, 10 μ L de cada oligonucleotídeo a 10 pmoles. μ L⁻¹ e 1 μ L do cDNA da amostra 24 horas SND. A reação de PCR foi estabelecida nas seguintes condições: 4 ciclos de 94 °C por 3 min, 43 °C por seg e 72 °C por 30 seg. Em seguida, mais 4 ciclos de 94 °C por 3 min, 48 °C por 30 seg e 72 °C por 30 seg, e mais 40 ciclos a 94 °C por 3 min, 50 °C por 30 seg e 72 °C por 30 seg, finalizando-se com uma extensão a 72 °C por 7 min.

Utilizaram-se 45 μ L do produto da PCR para serem fracionados por eletroforese a 100 volts em gel de agarose 1.5 % em tampão SB 1x (BRODY & KERN, 2004). O gel foi corado com brometo de etídeo (5 μ g.mL⁻¹) e visualizado por iluminação UV (302 nm).

Após a separação no gel, a banda obtida foi isolada com o auxílio de um bisturi esterilizado e, a partir dela, foi realizada uma re-amplificação por PCR utilizando um termociclador Perkin-Elmer 9700.

O volume total da PCR foi de 50 μ L, adicionando-se 2 μ L de cada dNTP a 10 mM na concentração final de 200 μ M, 3 μ L de MgCl₂ a 50 mM para uma concentração final de 3 mM, 1 U. μ L⁻¹ de Taq DNA polimerase (Platinum), 5 μ L de tampão Tris-HCl a 1mM de, 10 μ L de cada oligonucleotídeo a 10 pmoles. μ L⁻¹ e 1 μ L do cDNA da amostra 24 horas SND. A reação de PCR foi estabelecida nas seguintes condições: 40 ciclos de 94 °C por 30 seg, 50 °C por 30 seg e 72 °C por 30 seg, finalizando-se com uma extensão a 72 °C por 7 min.

Foram utilizados 45 μ L do produto da reação de PCR para serem fracionados por eletroforese a 100 volts em gel de agarose 1.5 % em tampão SB 1x (BRODY & KERN, 2004). O gel foi corado com brometo de etídeo (5 μ g.mL⁻¹) e visualizado por iluminação UV (302 nm).

Após a separação no gel, a banda obtida foi isolada com o auxílio de um bisturi esterilizado para posterior purificação e clonagem.

Para a purificação da banda obtida seguiu-se as orientações do Kit Amersham Biosciences G FXTM PCR DNA and Gel Band Purification Kit. Verificou-se a integridade do produto purificado, submetendo o mesmo à eletroforese a 100 volts em gel de agarose 1.5 % em tampão SB 1x (BRODY & KERN, 2004). O gel foi corado com brometo de etídeo (5 μ g.mL⁻¹) e visualizado por iluminação UV (302 nm).

Em seguida, foi realizada a ligação do produto amplificado em um vetor de clonagem pGEM-T easy seguindo as especificações do Kit de clonagem (Promega[®]). A ligação foi mantida a 8 °C por 17 horas. Após esse período, 2 μ L da ligação foram transferidos para um tubo contendo células competentes de *E. coli* DH10B.

Posteriormente, utilizou-se a técnica de eletroporação das bactérias, utilizando-se um eletroporador modelo BioRad[®] e em cubetas de 0.2 μ m foi aplicado um pulso de 1.8 KW durante 3.4 seg. Logo em seguida, foram transferidas para um tubo contendo meio líquido LB (Luria- Bertani, composto de triptona 10 g.L⁻¹, NaCL 10 g.L⁻¹ e extrato de levedura 5 g.L⁻¹) e mantidas durante 1 hora em agitação constante a 37 °C. Procedeu-se a uma centrifugação por 5 min a 2 mil rpm para a sedimentação das bactérias e o sobrenadante foi descartado. O volume restante foi plaqueado em meio sólido LB contendo ampicilina na concentração de 100 μ g.mL⁻¹, 4 μ l de IPTG (isopropiltio- β -D-galactosídeo) 1 M e 50 μ l de X-Gal (bromo cloro indol- β -D-galactosidase) 20 mg/ml. As placas foram mantidas a temperatura de 37 °C por 17 horas para promover o crescimento e isolamento de colônias contendo o inserto do fragmento de interesse (de cor branca).

As colônias isoladas foram transferidas para 5 mL de meio líquido LB com ampicilina a 100 μ g.mL⁻¹, e mantidas em agitação constante a 37 °C durante aproximadamente 17 horas.

Após o crescimento das colônias, 1.5 mL do volume foi submetido à centrifugação por por 1 min, a 13 mil rpm a 20 °C. O sobrenadante foi descartado, sendo esse procedimento repetido por mais uma vez. A seguir, o precipitado foi submetido à reação de MiniPrep (Mini Preparação de DNA Plasmidial), seguindo as especificações do Kit Bio 101 Rapid Pure Miniprep Kit (Biorad[®]). Para a verificação do DNA plasmidial foi realizada uma eletroforese a 100 volts em gel de agarose 1.5 % em tampão SB 1x (BRODY & KERN, 2004). O gel foi corado com brometo de etídeo (5 μg.mL⁻¹) e visualizado por iluminação UV (302 nm) para a verificação da integridade do produto.

Em seguida, procedeu-se à reação de digestão do plasmídio purificado para a avaliação do inserto. Cerca de 1 μ g de DNA plasmidial foi submetido à digestão com a enzima *Eco*RI (Fermentas[®]) por 2 horas a 37°C, seguindo as especificações do fabricante. Para a verificação da integridade do produto da digestão, esse foi submetido a uma eletroforese a 100 volts em gel de agarose 1.5 % em tampão SB 1x (BRODY & KERN, 2004). O gel foi corado com brometo de etídeo (5 μ g.mL⁻¹) e visualizado por iluminação UV (302 nm).

Por último, procedeu-se à reação de sequenciamento, seguindo as especificações do Kit Dyenamic Terminator – Amersham[®] ABI – 3100, em um aparelho de sequenciamento modelo ABI3100 (Apllayed Biosystem[®]), gentilmente fornecido pela Profa. Dra. Sui Mui Tsai (CENA, Piracicaba). A seqüência obtida foi analisada através do programa BLAST (n) e tBLAST(x) do NCBI localizado no "site" <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov</u>, para a confirmação da seqüência de interesse.

III.7 Determinação da fase de replicação do material genético

Incorporação por [H³] timidina

Essa metodologia foi realizada sob a supervisão do Prof. Dr. Carlos Frederico Menck (ICB/USP) e da Prof. Dra. Marie-Anne Van Slyus (IB/USP).

Para a análise, foram utilizadas amostras dos tempos de coleta 4, 12, 16 e 24 horas para os explantes C e SND. Os explantes foram cultivados em placas de Petri, contendo meio MS líquido adicionado por 2 μ Ci de [H³] timidina e mantidos sob fotoperíodo de 16 horas de luz, irradiância de 40 μ moles m⁻²s⁻¹ e em temperatura de 25 ± 2 °C. Os tempos da coleta foram os mesmos descritos acima, seguindo o mesmo procedimento descrito no item III.1.3.

As amostras, em triplicatas com cerca de 400 mg de MF, foram maceradas em nitrogênio líquido. Ao macerado, adicionaram-se 2 mL de ácido tricloroacético (TCA) 5 % gelado e após 1 hora no gelo, foram centrifugadas a 5 mil rpm por 20 min a 4 °C, sendo descartado o sobrenadante. Em seguida, às amostras adicionou-se 1 mL de TCA 5 % gelado, foram agitadas em vórtex e centrifugadas nas mesmas condições, sendo descartado o sobrenadante.

Posteriormente, foi adicionado 1 mL de etanol 100 % gelado, procedendo-se à agitação em vórtex e nova centrifugação nas mesmas condições. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspenso em 350 μ L de NaOH 1 M, passando por uma incubação a 37 °C por 30 min. Alíquotas de 120 μ L, em duplicatas, foram utilizadas para contagem radioativa em um cintilômetro (TRI CARB 2100 TR, Packard[®]).

III.8 Análise Estatística

A análise dos dados foi efetuada, utilizando-se uma análise de variância (ANOVA).

IV. Resultados

Foi possível obter resultados interessantes no que se refere à influência de alguns fatores endógenos sobre o processo de indução da retomada do ciclo celular em primórdios de gemas axilares de abacaxizeiro.

IV.1 Análise hormonal endógena

O estudo dos hormônios endógenos foi realizado por meio da análise em HPLC visando à separação dos hormônios, a qual foi acoplada a diferentes métodos de dosagem: o imuoensaio ELISA ou a espectrometria de massas (figura 4), possibilitando a validação dos dados obtidos.

A seguir, estão apresentados os dados de dosagem obtidos para AIA, ABA e das citocininas identificadas no material estudado.

IV.1.1 Citocininas

Procedeu-se à dosagem de 12 tipos de citocininas, utilizando a metodologia de dosagem por LC/MS-MS, a saber: *cisZ, transZ, cisZR, transZR*, iP, iPR, iPRMP, iP9G, DHZ, DHZR, DHZRMP, DHZ9G. Essa quantificação tinha por objetivo validar a dosagem das citocininas obtida por ELISA (iP, iPR, Z e ZR). Além disso, visava-se conhecer um maior número de citocininas envolvidas no processo de desenvolvimento de primórdios de gemas axilares em abacaxizeiro. Entretanto, só foi possível a validação de 4 tipos de citocininas (iP, iPR, Z e ZR), não sendo detectados níveis endógenos para os outros tipos.

A partir das dosagens das citocininas, foi possível verificar diferenças importantes ao longo das 24 horas analisadas. Optou-se por expressar as citocininas do tipo-iP, somando-se os teores iP + iPR e as citocininas do tipo-Z, somando-se os teores de Z + ZR.

Logo na 1^a hora de cultivo, os teores endógenos das citocininas do tipo-iP (iP + iPR) apresentaram-se próximos aos detectados nos explantes C, sendo que durante o período de análise mantiveram-se sempre maiores nos explantes SND em relação ao controle (figura 8).

Após 1 hora de cultivo, houve um aumento dos teores de iP + iPR em ambos os explantes, maior nos explantes SND, sendo que após 16 horas esse aumento foi mais acentuado para SND, atingindo um valor de 71.7 pmoles.g MF^{-1} , em contraste aos 44.7 pmoles.g MF^{-1} ,verificados nos explantes C na 24^{a} hora de cultivo (figura 8).



Figura 8: Teores endógenos das citocininas iP + iPR em segmentos nodais decapitados (SND) e em segmentos nodais com o ápice (C) de plantas de *Ananas comosus* cultivadas *in vitro* num período de 24 horas obtidos por ELISA. Barras verticais indicam propagação de erro.

Com relação às citocininas do tipo-Z (Z + ZR), logo após a 1^a hora de cultivo, os seus teores endógenos foram reduzidos em ambos os explantes, sendo que nos explantes SND as concentrações eram menores em relação ao controle. A partir desse momento, até 12 horas, não foram verificadas diferenças marcantes nos teores das citocinias do tipo-Z entre os explantes C e SND. Entretanto, após a 12^a hora, os níveis desses hormônios apresentaram um aumento acentuado e progressivo nos explantes SND, atingindo valores de 53.9 pmoles.g MF ¹ na 24^a hora de cultivo, sendo que nos explantes C o teor encontrado nesse momento foi de 14.25 pmoles.g MF⁻¹ (figura 9).



Figura 9: Teores endógenos das citocininas Z + ZR em segmentos nodais decapitados (SND) e em segmentos nodais com o ápice (C) de plantas de *Ananas comosus* cultivadas *in vitro* num período de 24 horas obtidos por ELISA. Barras verticais indicam propagação de erro.

IV.1.2 Ácido Indolil-3-Acético - AIA

A partir da separação do AIA em HPLC e dosagem no GC-MS-SIM, com a validação de algumas amostras por ELISA, foi possível verificar que nos explantes SND os teores endógenos mantiveram-se sempre menoress em relação aos explantes C, ou seja, naqueles mantidos com o ápice (figura 10).

Logo após 1 hora de cultivo ocorreu um aumento de AIA em ambos os explantes, sendo que nos explantes C esse aumento se manteve progressivo até a 12^{a} hora, voltando a aumentar após a 16^{a} hora. Nos explantes SND, os teores endógenos mantiveram-se praticamente constantes até a 16^{a} hora, sendo que uma tendência de aumento foi observada a partir desse momento (figura 10).



Figura 10: Teores endógenos de AIA em segmentos nodais decapitados (SND) e em segmentos nodais com o ápice (C) de plantas de *Ananas comosus* cultivadas *in vitro* num período de 24 horas obtidos por dosagem em CG-MS-SIM.

IV.1.3 Balanço hormonal AIA/Citocininas totais (AIA/CITs)

(AIA/iP + iPR + Z + ZR)

No presente trabalho verificou-se que logo na 1^a hora após a decapitação o balanço AIA/CITs foi menor nos explantes SND em relação aos explantes C. Esse balanço manteve-se sempre menor nos explantes SND durante as 24 horas estudadas, principalmente a partir da 16^a hora (figura 11).



Figura 11: Razão AIA/CITs obtida para os segmentos nodais decapitados (SND) e para os segmentos nodais com o ápice (C) de plantas de *Ananas comosus* cultivadas *in vitro* num período de 24 horas.

A diminuição da razão AIA/CITs nos explantes SND pode ser explicada por dois fatores: nos explantes SND as concentrações de AIA mantiveram-se sempre menores e as de citocininas totais apresentaram-se maiores em relação aos valores obtidos para os explantes C (tabela 2).

Tabela 2: Médias dos valores obtidos de dosagem hormonal para AIA e CITs e a razão obtida entre AIA/CITs em segmentos nodais decapitados (SND) e em segmentos nodais com o ápice (C) de plantas de *Ananas comosus* cultivadas *in vitro* num período de 24 horas.

t (h)	AIA	CITs	AIA/CITs	AIA	CITs	AIA/CITs
1	4,64	53,88	0,09	6,19	58,93	0,11
2	5,98	60,65	0,10	7,56	61,14	0,12
3	4,84	81,57	0,06	8,13	47,74	0,17
4	4,58	71,93	0,06	8,54	40,53	0,21
8	5,07	59,16	0,09	7,37	40,94	0,18
12	4,91	62,00	0,08	9,26	41,40	0,22
16	3,95	75,37	0,05	5,37	25,81	0,21
20	4,39	101,05	0,04	6,38	22,27	0,29
24	5,48	125,68	0,04	7	59,19	0,12

IV.1.4 Ácido Abscísico

A figura 12 indica que até a 20^a hora houve uma redução progressiva dos teores endógenos de ABA nos explantes C e SND, sendo que a partir desse momento ocorreu um aumento nas suas quantidades em ambos os explantes. Foi possível verificar que nas primeiras 2 horas após a decapitação, os teores de ABA nos explantes SND mantiveram-se inferiores aos teores encontrados nos explantes C.



Figura 12: Teores endógenos de ABA em segmentos nodais decapitados (SND) e em segmentos nodais com o ápice (C) de plantas de *Ananas comosus* cultivadas *in vitro* num período de 24 horas obtidos por ELISA. Barras verticais indicam o desvio padrão (n = 4).

IV.2 Açúcares solúveis

Após a quantificação dos açúcares totais, procedeu-se à separação em HPLC dos açúcares sacarose, glicose e frutose.

Em relação aos teores de sacarose, foi possível observar que ocorreram diferenças acentuadas nos teores desse dissacarídeo entre os dois explantes. Logo a partir da 1^a hora de cultivo os teores endógenos de sacarose aumentaram progressivamente nos explantes SND, mantendo sempre níveis mais elevados em relação aos explantes C (figura 13).



Figura 13: Teores endógenos de sacarose em segmentos nodais decapitados (SND) e em segmentos nodais com o ápice (C) de plantas de *Ananas comosus* cultivadas *in vitro* num período de 24 horas. Barras verticais indicam o desvio padrão (n = 3).

A análise da figura 14 permite observar que, com relação aos teores de glicose e frutose, de modo geral, não ocorreram diferenças marcantes entre os explantes C e SND. Entretanto, na 4^{a} hora de cultivo, os teores de glicose e frutose apresentaram um pico de aumento nos explantes SND, e após a 20^{a} hora indicaram um novo aumento nesses explantes.



Figura 14: Teores endógenos de glicose (A) ou frutose (B) em segmentos nodais decapitados (SND) e em segmentos nodais com o ápice (C) de plantas de *Ananas comosus* cultivadas *in vitro* num período de 24 horas. Barras verticais indicam o desvio padrão (n = 3).

A tabela 3 mostra os valores da razão obtida entre a somatória das concentrações de hexoses (glicose e frutose) sobre as de sacarose. Esses valores estão também representados na figura 14, sendo possível observar que durante o período analisado essa razão manteve-se maior nos explantes C (tabela 3). Foi possível também verificar uma redução gradativa dessa razão nos explantes SND a partir de 1^a hora de cultivo, indicando o aumento progressivo dos teores de sacarose nos explantes SND a partir da 1^a hora de cultivo.

	Glicose		Fru	Frutose		Sacarose		Hexoses/Sacarose	
t (h)	С	SND	С	SND	С	SND	C	SND	
1	7,92	6,73	7,42	6,30	1,20	1,18	12,81	11,07	
2	6,66	6,22	6,47	5,82	0,97	1,37	13,47	8,77	
3	6,61	6,57	6,45	6,19	1,27	1,93	10,30	6,61	
4	6,30	7,73	6,23	7,37	1,25	1,83	10,00	8,25	
8	5,20	5,58	5,37	5,69	1,51	2,36	7,01	4,77	
12	5,72	5,73	5,98	5,84	1,71	3,29	6,83	3,52	
16	6,53	6,14	6,95	6,51	1,43	2,92	9,43	4,33	
20	6,44	5,25	6,72	5,54	1,54	3,08	8,57	3,51	
24	6,23	7,61	6,28	8,04	1,23	3,58	10,15	4,37	

Tabela 3: Valores de dosagem dos açúcares solúveis glicose, frutose e sacarose e a razão obtida Hexoses / Sacarose em segmentos nodais decapitados (SND) e em segmentos nodais com o ápice (C) de plantas de *Ananas comosus* cultivadas *in vitro* num período de 24 horas.



Figura 14: Razão Hexoses / Sacarose em segmentos nodais decapitados (SND) e em segmentos nodais com o ápice (C) de plantas de *Ananas comosus* cultivadas *in vitro* num período de 24 horas.

IV.3 Amido

Com relação aos explantes SND, verificou-se um aumento acentuado logo na 1^a hora nos teores de amido, cuja quantidade se manteve quase constante até a 3^a hora. A partir desse momento, ocorreu uma redução progressiva até a 24^a hora. Nos explantes C, os teores de amido aumentaram progressivamente até a 3^a hora, sendo que a partir desse momento houve uma acentuada e também progressiva redução do conteúdo de amido (figura 15).

Foi possível observar que, exceto na 1^a e na 24^a horas, os valores de concentração de amido mantiveram-se maiores nos explantes C em relação aos explantes SND (figura 15).



Figura 15: Teores de amido em segmentos nodais decapitados (SND) e em segmentos nodais com o ápice (C) de plantas de *Ananas comosus* cultivadas *in vitro* num período de 24 horas. Barras verticais indicam o desvio padrão (n = 3).

IV.4 Aminoácidos

Na figura 16 foram apresentados os teores relativos dos aminoácidos livres dosados nos explantes SND e C. Os resultados indicam que a concentração de asparagina representou cerca de 97 % em relação ao total dos aminoácidos, em ambos os explantes.



Figura 16: Teores endógenos de todos os aminoácidos livres dosados em segmentos nodais decapitados (SND) e em segmentos nodais com o ápice (C) de plantas de *Ananas comosus* cultivadas *in vitro* num período de 24 horas.

A alta porcentagem de asparagina dificulta a visualização do grau de participação dos outros aminoácidos no processo estudado. Assim, foi proposta uma outra forma de visualização dos aminoácidos de menor importância (em termos de concentração), retirandose os valores correspondentes à asparagina. Calculou-se então, a porcentagem de cada um dos outros aminoácidos sobre o total subtraído de asparagina. A figura 17 mostra, que glutamina + glicina, aspartato e glutamato apresentaram, nessa ordem, maiores teores em relação aos outros aminoácidos.



Figura 17: Teores endógenos de todos os aminoácidos livres dosados, exceto a asparagina (asn), em segmentos nodais decapitados (SND) e em segmentos nodais com o ápice (C) de plantas de *Ananas comosus* cultivadas *in vitro* num período de 24 horas.

Na figura 18 estão apresentados os teores endógenos de aminoácidos encontrados nos explantes controles SND e C. Foram detectados os seguintes aminoácidos: asparagina, glutamina + glicina, aspartato, glutamato, alanina, prolina, fenilalanina, isoleucina, valina, arginina + treonina, histidina, lisina, metionina, GABA, leucina e triptofano (citados em ordem de maior concentração).









Figura 18: Teores endógenos de aminoácidos livres em segmentos nodais decapitados (SND) e em segmentos nodais com o ápice (C) de plantas de *Ananas comosus* cultivadas *in vitro* num período de 24 horas. A – asparagina, B – glutamina +glicina, C – aspartato, D – glutamato, E – alanina, F – prolina, G – fenilalanina, H – isoleucina, I – valina, J – arginina + treonina, K – histidina, L – lisina, M – metionina, N – GABA, O – leucina, P – triptofano. Barras verticais indicam o desvio padrão (n = 3).

A análise da figura 18 permitiu verificar que nos explantes SND os teores dos aminoácidos mantiveram-se menores em relação ao controle, durante as primeiras 2 horas com relação ao aspartato, arginina + treonina, alanina e fenilalanina, durante as primeiras 4 horas para asparagina, glutamina + glicina, GABA e triptofano e nas primeiras 12 horas para glutamato, isoleucina e leucina.

Logo após a 1^a hora de cultivo foi identificado, nos explantes SND, um aumento nos teores endógenos dos aminoácidos asparagina, glutamina + glicina, aspartato, glutamato, arginina + treonina, histidina, lisina, GABA, leucina e triptofano (figura 18). Foi possível constatar que alguns dos aminoácidos tiveram seus teores endógenos aumentados nos explantes SND de forma mais acentuada, a partir de 12 horas. Esse aumento ocorreu mais

expressivamente para glutamato e alanina, e menos pronunciadamente para prolina e GABA. De forma menos acentuada, foi observado após 20 horas de cultivo um aumento nos teores de metionina, isoleucina, fenilalanina e arginina + treonina nos explantes SND (figura 18).

IV.5 Análise da expressão dos genes CycD2;1 e H2A em Real Time-qPCR

Com o objetivo de confirmar a especificidade dos fragmentos obtidos a serem utilizados nas análises em Real Time-qPCR, foi realizada uma amplificação de cada fragmento em uma reação de PCR.

A figura 19 mostra as bandas referentes aos produtos obtidos por amplificação de Rib 18S, GAPDH, CycD2;1 e H2A. Em seguida, procedeu-se à purificação das bandas e ao sequenciamento (anexo 2). As seqüências obtidas foram analisadas por meio do programa BLAST(n), disponível no "site" <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov</u>, obtendo-se a confirmação de que se tratavam das seqüências dos genes de interesse.



Figura 19: Eletroforese em gel de agarose a 1.5 %, indicando o fracionamento dos produtos obtidos por amplificação em PCR. Na seqüência: Rib 18S (a), GAPDH (b), CycD2;1 (c) e H2A (d). À esquerda, padrão utilizado de tamanho em pares de bases de 100 Kb (P). Seta indica banda com cerca de 500 pb.

Os dados obtidos por RT -qPCR foram analisados pelo programa BestKeeper, e observou-se que o Rib 18S é o gene de menor variação no padrão de expressão, podendo ser considerado o melhor constitutivo quando comparado ao GAPDH. Assim, esse gene foi utilizado como o gene de referência às análises de expressão dos genes CycD2;1 e H2A.

A figura 20 mostra que a expressão dos genes CycD2;1 e H2A seguiram o padrão de expressão inicial, com um aumento nos teores de RNAm logo na 1^a hora nos explantes SND. Em seguida, foi observada uma redução na expressão de ambos os genes, a qual foi seguida por uma nova elevação em 8 horas nos explantes SND. Após 12 horas, verificou-se expressões semelhantes de CycD2;1 e H2A em ambos os explantes.



Figura 20: Padrão de expressão obtido por meio de Real Time-PCR dos genes CycD2;1 (a) e H2A (b), em relação ao gene de expressão constitutiva Rib18S.

Considerando o tempo zero (coleta do segmento nodal contendo o primórdio de gema , equivalente ao explante SND, na planta-mãe) como o momento no qual não haveria variação de expressão dos genes de interesse em relação ao gene de referência Rib 18S (valor de expressão relativa = 1), a expressão relativa foi considerada significante quando foi 2 vezes maior que o valor de expressão no tempo zero. Este fato ocorreu com maior relevância em 1 hora e 8 horas nos explantes SND.

Com relação ao produto de PCR amplificado com o oligonucleotídeo degenerado para CycB1;1 foi subclonado em vetor pGEM-T (Promega[®]). Alguns clones bacterianos que cresceram em meio seletivo foram submetidos à extração plasmidial, sendo posteriormente seqüenciados. A partir das seqüências obtidas não foi possível verificar homologia com ciclinas, necessitando novos clones para serem seqüenciados. Uma outra abordagem possível seria a obtenção de uma seqüência homóloga de CycB2;1 a partir da biblioteca de cDNA de abacaxizeiro. Entretanto, essa seqüência ainda não foi depositada no banco de dados.

IV.6 Análise do conteúdo de DNA

Fora realizadas, tentativamente, análises do conteúdo de DNA dos explantes SND e C nas 24 horas analisadas por Real Time-PCR e por fluorimetria. Entretanto, não foram obtidos resultados confiáveis que corroborassem àqueles relativos à incorporação de [H³]timidina, bem como àqueles relacionados com o padrão de expressão dos genes estudados.

IV.7 Incorporação de [H³]timidina

A análise da incorporação de [H³]timidina foi feita para ambos os explantes nos tempos de 4, 12, 16 e 24 horas de cultivo. A figura 21 mostra que em todos os tempos de coleta, a incorporação de [H³]timidina foi maior nos explantes SND em relação ao controle, sendo que essa incorporação aumentou de modo progressivo, principalmente nos explantes SND na 16^a e na 24^a horas. Em 12 horas de cultivo, a incorporação nos explantes SND foi 21 % maior em relação aos explantes C, sendo que essa diferença aumentou para 31 % em 16 horas e para 42 % em 24 horas de cultivo.



Figura 21: Incorporação de $[H^3]$ timidina em segmentos nodais decapitados (SND) e em segmentos nodais com o ápice (C) de plantas de *Ananas comosus* cultivadas *in vitro* num período de 24 horas. Barras verticais indicam o desvio padrão (n = 3).
V. Discussão

Os resultados obtidos permitiram uma discussão interessante levando em conta a sinalização de diferentes fatores endógenos na retomada do ciclo celular em primórdios de gema de abacaxizeiro. Poucos são os trabalhos que abordam essa questão em nível tecidual, sendo a maioria realizada utilizando como modelo cultura de células em suspensão.

V.1 Hormônios

O fenômeno do controle da gema apical sobre primórdios de gemas axilares ou das gemas axilares propriamente ditas, pode ser considerado um evento de correlação, ou seja, o controle da forma ou da função de uma parte da planta por outra, sendo esse fenômeno conhecido como dominância apical (CLINE, 1994).

Vários estudos mostraram que a regulação da dominância apical é controlada por interações complexas entre fatores nutricionais e substâncias promotoras ou inibidoras de crescimento (CHEN *et al.*, 1997), destacando-se a atuação hormonal, especialmente a participação de auxinas e citocininas. Muitos aspectos dos processos de divisão e diferenciação celular nas plantas são controlados pela interação auxina-citocinina. Mais recentemente, demonstrou-se que o ciclo celular é influenciado diretamente pelos hormônios vegetais (FRANCIS & SORRELL, 2001).

V.1.1 Citocininas

Foi possível verificar que na 1^a hora de cultivo dos segmentos nodais de abacaxizeiro, os teores das citocininas do tipo-Z apresentaram-se menores nos explantes SND em relação aos explantes C, sendo que logo após esse momento ocorreu uma redução nos teores dessas citocininas em ambos os explantes (figura 8). As citocininas do tipo-iP dosadas nos explantes SND apresentaram valores próximos aos obtidos nos explantes C na 1^a hora de cultivo.

Alguns estudos afirmaram que não haveria a necessidade de elevados teores endógenos de citocininas, logo após a decapitação, para ocorrer, posteriormente, o crescimento da gema axilar. VAN STADEN *et al.* (1981) analisaram comparativamente os conteúdos hormonais em gemas axilares de roseiras decapitadas e não decapitadas. Esses autores relacionaram os menores teores endógenos de citocininas livres com a maior capacidade da gema axilar em retomar o seu crescimento, sendo Z e ZR as principais citocininas encontradas.

Entretanto, logo após a 1^a hora da decapitação nos explantes de abacaxizeiro, houve um aumento nos teores das citocininas iP + iPR nos explantes SND, mantendo-se sempre maiores em relação aos encontrados nos explantes C (figura 8). Com relação às citocininas do tipo-Z, os explantes SND mostraram um aumento somente a partir de 12 horas de cultivo, apresentando concentrações dessas citocininas sempre superiores às detectadas nos explantes C (figura 9).

O aumento nos teores endógenos de citocininas nos explantes SND pode ser confirmado com a análise do balanço AIA/CITs, sempre menor nos explantes SND (tabela 2). Vários pesquisadores propõem que as auxinas podem inibir a síntese de citocininas. Assim, possivelmente o AIA presente no ápice caulinar nos explantes C, transportado basipetamente, influenciou negativamente a síntese de citocininas dos próprios segmentos caulinares, reduzindo a concentração das mesmas nos explantes C.

Em um trabalho realizado anteriormente, utilizando o mesmo material, isto é, segmentos nodais contendo o primórdio de gema axilar de abacaxizeiro, SOUZA *et al.* (2003) analisaram os teores endógenos de hormônios durante um período de 15 dias após a quebra da dominância apical. Esses autores verificaram que os maiores teores de citocininas encontrados nos explantes SND correlacionaram-se com o aumento de divisões celulares (observado no tecido por meio de microscopia óptica), resultando na formação de uma nova planta aos 15 dias de cultivo, o que não ocorreu nos explantes C, que sempre apresentaram menores teores endógenos de citocininas.

Algumas pesquisas analisaram a indução da divisão celular em processos organogenéticos, relacionando-a com a concentração de citocininas no órgão estudado. USCIATI *et al.* (1972) observaram, em gemas axilares de plantas de *Cicer arietinum* tratadas com BA, divisões celulares após 1 hora da remoção do ápice. TURNBULL *et al.* (1997) dosaram os teores de citocininas em gemas laterais de plantas de grão-de-bico durante a quebra da dominância apical e observaram que nas primeiras 2 horas após a remoção do ápice houve pouca alteração no teor de citocininas dessas gemas. Entretanto, após 6 horas da remoção, observaram-se um aumento de 7 vezes nas concentrações das citocininas, quando, então, as divisões celulares e o crescimento da gema eram mais evidentes. Após 24 horas, esse aumento se intensificou ainda mais, cerca de 25 vezes, sendo ZR a principal citocinina

Em um trabalho recente, BREDMOSE *et al.* (2005) analisaram as variações nos teores endógenos de citocininas em gemas axilares em plantas de *Rosa* sp e verificaram que a biossíntese local de citocininas nas gemas e, especificamente as citocininas do tipo ZR e

109

iPRMP, influenciam positivamente o desenvolvimento das gemas axilares, apresentando níveis aumentados à medida que ocorreu o desenvolvimento das mesmas. Esses autores definiram seis estágios durante o desenvolvimento das gemas, sendo que logo no início do desenvolvimento houve diferenças marcantes nos teores das citocininas. Primeiramente, ocorreu um aumento de iPRMP, que, provavelmente, propiciou a biossíntese das citocininas iPR e ZRMP, importantes na promoção da divisão celular nas gemas em desenvolvimento.

Vale ressaltar que nos segmentos nodais do abacaxizeiro, os maiores teores endógenos de citocininas nos explantes SND não foram originados das raízes, mas sim de uma possível biossíntese no próprio tecido do explante. WANG & WAREING (1979), analisando plantas de *Solanum andigena*, cujas raízes e ápices caulinares foram removidos, observaram que as gemas laterais foram capazes de sintetizar suas próprias citocininas, crescendo na ausência do sistema radicular.

Como já comentado anteriormente, no caso dos segmentos nodais de abacaxizeiro, as primeiras citocininas a terem seus conteúdos aumentados foram as do tipo-iP, logo após a 1^a hora da decapitação. As citocininas do tipo-Z também tiveram seus teores incrementados, após 12 horas da eliminação do ápice. Esses dados poderiam indicar que, as citocininas iP + iPR teriam sinalizado a retomada do ciclo celular nos explantes SND e que as citocininas do tipo-Z teriam um papel posterior na indução da divisão celular nesses explantes.

Recentemente, foi confirmada a atuação das citocininas na indução da divisão celular. WERNER *et al.* (2003) utilizaram plantas transgênicas de *A. thaliana*, que apresentavam a expressão dos genes de citocinina oxidase aumentada, verificaram uma redução da atividade dos meristemas apicais vegetativo ou floral e do primórdio foliar, quando comparada à atividade meristemática das plantas selvagens. Esses resultados indicaram a essencialidade dessa classe hormonal para a ocorrência da proliferação celular. Os autores observaram, ainda, um tamanho reduzido do meristema apical caulinar, atribuindo às citocininas as funções de controle da proliferação celular e da regulação da transição de células indiferenciadas em diferenciadas.

ZAZÍMALOVÁ *et al.* (1996) utilizaram uma cultura de células de tabaco VBI-0 dependente de auxina e independente de citocininas e verificaram a dinâmica na variação dos níveis endógenos de citocininas. Nas células submetidas a um valor ótimo de concentração de auxina verificou-se que os maiores valores dosados das citocininas iP e iPR estavam correlacionados com o início das divisões celulares.

Em um interessante trabalho foi enfatizada a atuação da zeatina na divisão celular. CABONI *et al.* (2002) estudaram o desenvolvimento de gemas adventícias a partir da formação de calo em ápices vegetativos de *Pyrus communis*. Utilizando a técnica de localização *in situ* os autores verificaram um acúmulo de citocininas do tipo-Z nas células em divisão do calo, no meristema das novas gemas formadas à partir deste, bem como nas células dos primórdios foliares da gema adventícia em formação. Esses autores sugeriram um papel de zeatina na divisão celular no que se refere à formação de calo, bem como na divisão e diferenciação celular levando ao desenvolvimento de novas gemas.

A partir da análise dos dados de incorporação de timidina triciada nos explantes de abacaxizeiro (figura 21), sugere-se que as células do primórdio de gema axilar nos explantes SND estariam, na sua maioria, em G1 até a 20^a hora, por ter sido verificado apenas um pequeno aumento na incorporação de timidina triciada nesses explantes até o momento. Provavelmente, a reduzida incorporação que se observou nos tempos de coleta analisados (4 horas, 12 horas e 16 horas) trata-se da incorporação das células adjacentes ao primórdio de gema axilar, que poderiam estar em fase de replicação (fase S), em se tratando de um tecido não sincronizado. Mais especificamente, pode-se supor que a maioria das células no

primórdio gemífero dos explantes SND estaria numa fase inicial da transição G1/S até 12 horas e, após esse período, numa fase posterior da transição. Na 24^a hora, foi verificado um aumento de 42 % da incorporação de timidina triciada nos explantes SND em relação aos explantes C. Sendo assim, é possível que nesse momento seja iniciada a fase S na maioria das células do primórdio nos explantes SND.

Se observarmos o padrão de expressão gênico (figura 20), verifica-se que ocorreu um aumento acentuado na expressão da ciclina CycD2;1 e da histona H2A na 1^a e na 8^a hora nos explantes SND. Esse aumento pode ter sido sinalizado pelo incremento das concentrações das citocininas, promovendo a maioria das células do primórdio de gema axilar a entrarem na fase S em 24 horas. É possível que as citocininas do tipo-iP atuem no começo da sinalização para a retomada do ciclo celular, ou seja, no início da transição G1/S e que os maiores níveis de Z + ZR, observados nos explantes SND após 12 horas, sinalizem a retomada das divisões celulares no final da transição G1/S do material estudado, bem como na entrada da fase S, em 24 horas.

Alguns trabalhos demonstraram que podem ser encontrados níveis reduzidos de zeatina nas primeiras fases do ciclo celular e, que sua atuação, seria em fases mais posteriores. LAUREYS *et al.* (1999) procuraram explicar qual seria a atuação de Z no ciclo celular na cultura de células sincronizadas de tabaco BY-2. Eles observaram que na transição G1/S há baixos teores endógenos de citocininas, sendo que a adição de lovastidina (inibidor da biossíntese de citocininas) anteriormente à G1 causou uma redução dos níveis de citocininas, mas não afetou a progressão do ciclo na transição G1/S. Entretanto, se Z fosse adicionada na presença de lovastidina, não ocorria a progressão para a fase S. Esses autores concluíram que há a necessidade de menores teores endógenos de Z logo no início da retomada do ciclo celular para ocorrer a progressão G1/S. Esses autores ainda sugeriram que a redução de

citocininas no início da fase G1 pode funcionar como um sinal para tornar o sistema sensível novamente a esses hormônios, sendo reconhecidos como um novo sinal indutor para a progressão do ciclo celular.

Em um outro trabalho, LAUREYS *et al.* (1998) verificaram que a zeatina foi indispensável à transição da fase G2 para M em cultura de células sincronizadas BY-2 de tabaco, sendo que várias outras formas foram dosadas (ZR, DHZ, iP, iPR, BA) e somente Z foi encontrada como atuando nessa transição do ciclo celular. Esses autores verificaram, ainda, que com a aplicação de lovastidina, um inibidor da síntese de ácido mevalônico e conseqüentemente da biossíntese de citocininas, não houve a progressão para a fase M. A adição de zeatina levou à progressão do ciclo celular, bloqueado por lovastidina, confirmando a hipótese da atuação da Z são limitantes na transição G2/M nessa cultura de células.

Outros trabalhos mostraram também que citocininas do tipo-Z atuariam na fase S do ciclo celular e na mitose. REDIG *et al.* (1996) analisaram a correlação entre a progressão do ciclo celular e os níveis hormonais endógenos em suspensão de células sincronizadas (na fase S) de tabaco BY-2, verificando a participação de citocininas no fim da fase S (cerca de 3 horas após a liberação da sincronização) e na mitose (fase M, cerca de 7 horas após a liberação da sincronização). Esses autores sugeriram que a ação das citocininas, especialmente dos tipos zeatina (Z, ZR, ZMP) e, em menor proporção dihidrozeatina (DHZ), é baseada em uma interação com cinases e com complexos cinases-ciclinas, que regulam a progressão do ciclo celular em pontos específicos, ou seja, nas transições G1/S e G2/M.

DOBREV *et al.* (2002) estudaram as variações nos níveis endógenos de citocininas durante a progressão do ciclo celular de cultura de células sincronizadas de tabaco da linhagem BY-2 e verificaram dois picos distintos de zeatina no início da fase S, semelhante ao verificado por REDIG *et al.* (1996), diferindo deste pelo pico inicial de citocinina ter sido

observado no final da fase S. RIOU-KHAMLICHI *et al.* (1999) reportaram num trabalho com cultura de células e em plantas de *A. thaliana* um aumento nos níveis de CycD3 induzido por citocininas no início da transição G1/S.

No presente trabalho, vale observar que ocorreu expressão dos genes CycD2;1 e H2A nos explantes C (figura 20), indicando que possivelmente também há divisão celular nesses tecidos. Entretanto, nesse caso, a divisão celular estaria correlacionada com o processo de crescimento dos tecidos e não com a organogênese. SOUZA *et al.* (2003) verificaram que nunca houve a formação de novas plantas a partir dos primórdios de gema axilares contidos nos explantes C, mas somente a partir dos explantes SND. Sendo assim, o processo de divisão celular pode estar associado tanto ao processo de formação de uma gema axilar que originará uma nova planta, quanto com o crescimento o crescimento e manutenção das células do segmento nodal.

V.1.2 Auxina

No presente trabalho foi verificado que os teores endógenos de AIA mantiveram-se sempre superiores nos explantes C, isto é, naqueles mantidos com ápice (figura 10). CHATFIELD *et al.* (2000) verificaram que o crescimento de gemas axilares contidas em segmentos caulinares isolados de *A. thaliana* foi inibido por quantidades fisiológicas de auxinas, indicando uma correlação negativa entre as concentrações dessa classe hormonal e o crescimento do primórdio de gema axilar.

Alguns estudos sugerem que o <u>t</u>ransporte <u>p</u>olar de <u>a</u>uxinas (TPA) seria a causa da manutenção da dominância apical exercida pelo ápice, inibindo o desenvolvimento de gemas laterais (PILATE *et al.*, 1989; LI & BANGHERT, 1992; BANGERTH, 1994; TAMAS, 1995). Essa hipótese, bem discutida por CLINE (1991; 1994), afirma que o AIA transportado para as

gemas laterais (TPA) seria responsável pela inibição do seu crescimento. Entretanto, a eliminação do ápice, fonte direta e principal do hormônio reverteria, a situação. Essa hipótese explicaria os maiores teores de AIA encontrados nos explantes C, que são aqueles que não se desenvolvem em gemas caulinares e, portanto, não formam plantas.

Nos explantes SND do abacaxizeiro, verificou-se um início de aumento dos teores endógenos de AIA após 16 horas de cultivo. Trabalhando com o mesmo modelo em abacaxizeiro, SOUZA *et al.* (2003) verificaram que na 20^a hora, quando já se observava, por meio da análise histológica, algumas células em divisão, ocorreu um aumento de AIA, nos explantes SND que progrediu a partir daí. Atribuiu-se à nova gema em formação o incremento na concentração de AIA que passaria a atuar sintetizar o seu próprio AIA.

Alguns trabalhos mostraram o aumento de auxina endógena em gemas axilares associado com o próprio crescimento das gemas a partir do aumento de divisões celulares. HILMANN *et al.* (1977) encontraram o dobro da concentração de AIA em gemas laterais de feijoeiro decapitado, 24 horas após a remoção do ápice, coincidindo com um intumescimento dessas gemas. Em um outro estudo, PEARCE *et al.* (1995) detectaram um aumento dos níveis de AIA 6 horas após a decapitação, sendo que com 12 horas já era possível observar um intumescimento do primórdio de gema axilar de plantas de *Elytrigia repens*. De modo semelhante, GALOCH *et al.* (1998) determinaram os níveis de AIA em gemas laterais de plantas de *Betula pendula* e encontraram um aumento de AIA 24 horas após a decapitação. Esses autores sugeriram que a remoção da fonte de auxinas com a retirada do ápice, ocasiona a síntese de auxinas pela própria gema lateral, logo após a decapitação.

Outras pesquisas indicaram a participação direta da auxina na progressão do ciclo celular levando às divisões celulares, bem como na expansão celular. Ao trabalhar com células meristemáticas e células maduras de um fragmento tecidual isolado de *Riella*

helicophyla, sincronizadas em G1, G1/S ou final de S, OLIEV (1994) observou que houve diferenças entre essas células em relação à síntese de auxina e na competência delas em responder ao hormônio durante o ciclo celular, sugerindo que há necessidades distintas na concentração de auxina durante as diferentes fases do ciclo celular e que a transição G1/S é especificamente modulada por auxinas.

RICHARD *et al.* (2002) estudaram os efeitos de uma auxina (ANA, ácido naftaleno acético), uma citocinina (cinetina) e de um açúcares (sacarose) na expressão de certos genes relacionados ao ciclo celular de células em suspensão de *A. thaliana*. As ciclinas dos tipos A (CycA2;1) e D (CycD2;1) e uma cinase CDCA;1 foram induzidas por sacarose, sendo que o aumento dos níveis de RNAm de CycD2;1 foi verificado 30 min após a adição de sacarose e de CycD3;1 após 4 horas. Foi sugerido que CyCD2;1 representou um sinal primário de reposta à sacarose na indução do ciclo celular no início da transição G1/S e CycD3;1 atuaria posteriormente. As ciclinas A e D e a cinase CDCA;1 também foram induzidas pela auxina e pela citocinina, mas em menor intensidade. A ciclina do tipo B (CycB1;1) e a cinase CDCB1,1 foram induzidas quando da adição de auxina e citocinina ao meio, sendo que a sacarose induziu fracamente a expressão do gene CycB1;1.

V.1.3 Balanço AIA/CITs

A complexidade do controle hormonal em plantas é evidenciada pela existência de interações entre diferentes classes hormonais durante a regulação de processos do desenvolvimento vegetal. A interação auxina-citocinina é considerada a mais importante no controle do desenvolvimento vegetal, como nos processos de dominância apical e no desenvolvimento de raízes e gemas, bem como na regulação da divisão e diferenciação celular (KAMÍNEK *et al.*, 1997).

O estudo de SKOOG & MILLER, realizado em 1957, foi o primeiro a reportar a importância da aplicação conjunta de auxinas e citocininas no meio de cultura em processos organogenéticos, sugerindo que a morfogênese vegetal é regulada principalmente por essas duas classes hormonais. Esses autores observaram que houve uma relação inversa entre a concentração dos hormônios e a formação de raízes e gemas caulinares. Ou seja, o conteúdo relativo mais elevado de auxinas favoreceu o surgimento de raízes, enquanto que o conteúdo relativo mais elevado de citocininas favoreceu o aparecimento de gemas adventícias caulinares.

No presente trabalho, a relação AIA/CITs apresentou-se sempre menor nos explantes SND durante todo o período analisado, principalmente após a 16^a hora (tabela 2, figura 11). Essa menor relação obtida nos explantes SND se deveu à menor concentração de AIA nesses explantes associada com níveis mais elevados de citocininas. Esses balanços podem representar uma sinalização hormonal para as células do primórdio de gema axilar nos explantes SND, isto é, para aquelas células competentes a responder à indução hormonal, retomando o ciclo celular com a formação de uma gema axilar que se desenvolve e origina uma nova planta.

Com relação aos explantes C (mantidos com o ápice), os maiores teores de AIA regularam negativamente os níveis de citocininas, levando à não diferenciação do primórdio de gema axilar em uma nova planta, como já proposto por SOUZA *et al.* (2003). Vários estudos sugeriram que a auxina pode influenciar a dominância apical via inibição da síntese de citocininas nas gemas laterais.

PILATE *et al.* (1989) mostraram que auxinas e citocininas atuaram na regulação do crescimento de gemas laterais em rizomas de plantas de *Marsilea drummondii* na medida em que diferenças no conteúdo desses hormônios foram correlacionadas com variações no grau

de desenvolvimento das gemas. Esses autores concluíram que a conversão de iPR em citocininas do tipo Z foi necessária ao crescimento da gema lateral e ao crescimento do ramo. Sugeriu-se, ainda, que o balanço entre AIA e citocininas foi essencial ao crescimento da gema lateral, sendo que um balanço menor nas gemas foi encontrado após a quebra da dominância apical. Além disso, verificou-se que citocininas do tipo-Z apresentaram maior relevância nesse processo. A mesma conclusão de que o balanço AIA/CITs regula o desenvolvimento de gemas laterais após a quebra da dominância apical com a redução de AIA e aumento de citocininas nas mesmas, foi sugerida por EMERY *et al.* (1998) em *Lupinus angustifolia*, BLAZKOVA *et al.* (1999) em ervilha, CHEN *et al.* (1997) em azaléia, OKUBO *et al.* (1991) em *Antirrhinum majus.*

Mais recentemente, MADER *et a*l. (2003) dosaram os teores hormonais endógenos em gemas laterais de plantas de *Cicer arietinum* após a decapitação e verificaram que 1 hora após a retirada do ápice, os teores de ZR aumentaram, enquanto que os de AIA foram reduzidos nas gemas analisadas. Esses autores sugeriram que o aumento dessa citocinina foi resultante não somente do seu transporte para as gemas laterais via xilema, mas também pela biossíntese *de novo* nas gemas em desenvolvimento.

A interação auxina/citocinina pode ser melhor compreendida com a manipulação dos genes envolvidos no metabolismo e/ou transporte desses hormônios, ocasionando mudanças nas concentrações de ambos. EKLÖF *et al.* (1997) realizaram um estudo que objetivava conhecer a interação auxina/citocinina em plantas selvagens comparativamente às plantas transgênicas de tabaco. Plantas super-produtoras de citocininas (com expressão do gene *ipt*, que codifica a enzima isopenteniltransferase, responsável pela síntese da citocinina iPR) apresentaram conteúdos de AIA livre e conjugado inferiores aos das plantas selvagens, sendo reduzidos tanto a síntese quanto o metabolismo de AIA. Essas plantas apresentaram um

fenótipo com dominância apical reduzida, folhas enrugadas e poucas raízes. Por outro lado, plantas super-produtoras de auxinas (em função da expressão do gene *iaa*, que codifica uma enzima-chave envolvida na biosíntese de AIA) apresentaram níveis de citocinina inferiores aos das plantas selvagens, além de menor atividade da enzima citocinina oxidase. O fenótipo dessas plantas era de forte dominância apical, epinastia foliar e formação de raízes adventícias no ramo.

O grupo de pesquisadores liderado por NORDSTROM *et al.* (2004) também confirmaram que as auxinas e as citocininas interagem entre si influenciando a síntese um do outro, isto é, as auxinas exercem uma certa inibição sobre a síntese de citocininas e essas exercem uma certa inibição sobre a síntese de auxinas.

Mais recentemente, TANAKA *et al.* (2006) estudaram a regulação inibitória de auxina na biossíntese local de citocininas em segmentos nodais de plantas de ervilha antes e após a quebra da dominância apical. O controle se deu na indução da expressão do gene *ipt* que codifica a enzima-chave na biossíntese de citocininas, IPTase (em ervilha, o gene foi isolado a partir do oligonucleotídeo degenerado, *Psipt*). Anteriormente à eliminação do ápice não foram detectados transcritos dos genes *Psipt1* e *Psipt2*, sendo que após a decapitação, a expressão desses genes foi induzida, acarretando o acúmulo de citocininas endógenas. Em segmentos isolados houve também o aumento tanto da expressão desses genes, quanto o acúmulo de citocininas. Os autores concluíram que durante a dominância apical a auxina reprime a biossíntese local de citocininas em segmentos nodais, sendo que após a decapitação, citocininas provenientes da raiz, são produzidas localmente nos segmentos nodais. À medida que se processa o desenvolvimento da gema, com a formação de um novo ápice ativo, o AIA é sintetizado *de novo* reprimindo, novamente, a biossíntese de citocininas. Vale ressaltar que alguns trabalhos anteriores haviam demonstrado que a ação das auxinas foi direcionada à promoção da atividade da citocinina oxidase, diminuindo o conteúdo de citocininas ativas. ZHANG *et al.* (1995) estudaram os efeitos da aplicação exógena de auxina nos níveis endógenos de citocininas em tecido de plantas transgênicas de tabaco expressando o gene *ipt*. A aplicação da auxina ANA reduziu os teores endógenos de citocininas ativas em 84 % nas plantas transgênicas, verificando que auxina promoveu a atividade de citocinina oxidase no tecido transformado.

De modo oposto, BALLA *et al.* (2002) observaram que houve um aumento nos teores endógeno de AIA em gemas laterais de plantas de ervilha após o isolamento do ápice, coincidindo com um início de desenvolvimento da gema, seguido por um aumento de iPR e ZR com 24 horas em diante. Sugeriu-se que o aumento inicial de AIA e o posterior de citocininas induziram o início do desenvolvimento da gema, tendo o AIA o papel no controle da expansão celular e citocininas na ativação da divisão celular. Os autores sugeriram que o aumento de citocininas nas gemas isoladas é conseqüência da sua própria biossíntese na gema, já que o sistema foi isolado das raízes.

Portanto, no presente estudo, pode-se sugerir um efeito positivo do menor balanço AIA/CITs, obtido nos explantes SND (tabela 2; figura 11) na sinalização a retomada da divisão celular, já que houve uma maior expressão dos genes CycD2;1 e H2A (figura 20) em relação aos explantes C. Temporalmente, a sinalização para a indução do ciclo celular foi determinante nas primeiras horas após a eliminação do ápice nos explantes SND, já que a partir de 12 horas não houve diferenças marcantes na expressão dos genes analisados entre os explantes.

V.1.4 Ácido abscísico

Pouco se conhece a respeito da síntese, transporte e efeitos celulares do ABA no crescimento de gemas laterais, entretanto, muitos trabalhos indicam que a inibição do crescimento das gemas está estreitamente correlacionada com a presença do ABA nas mesmas.

No presente trabalho foi observada uma redução progressiva dos teores endógenos de ABA nos explantes C e SND até a 20^a hora, sendo que nas primeiras 2 horas após a decapitação, os teores mantiveram-se superiores nos explantes C em relação aos explantes SND (figura 12).

Similarmente aos resultados apresentados no presente estudo, também foi observada uma redução inicial de ABA no crescimento da gema lateral por outros autores.

GOCAL *et al.* (1991) detectaram redução no teor de ABA na proporção de 30-70% entre 4 e 24 horas nas gemas axilares de feijoeiro decapitado, em relação às de plantas intactas, após a decapitação. Com resultados semelhantes, GALOCH *et al.* (1998) determinaram os teores endógenos de ABA em gemas laterais de *Betula pendula* 24 horas e 5 dias após a decapitação das plantas, ou seja, antes e após o início do crescimento da gema. Esses autores encontraram concentrações reduzidas de ABA após a decapitação nesses dois períodos, sugerindo que o ABA atuaria como um inibidor do crescimento da gema lateral nessa espécie.

Em um trabalho mais recente, CHRISTIANSON (2000) observou o efeito inibitório da adição de ABA no desenvolvimento de gemas na alga *Funaria hygrometrica* mediado por citocininas. O efeito inibitório do ABA sobre o efeito estimulatório de citocininas foi mais pronunciado quando a exposição das gemas ao ABA ocorreu utilizando-se maiores concentrações desse hormônio e numa fase mais posterior do desenvolvimento. Esses dados

sugeriram que o ABA não bloqueia o efeito estimulatório de citocininas em etapas iniciais do desenvolvimento das gemas, não interferindo, portanto, na percepção inicial do sinal relativo às citocininas. MADER *et al.* (2003) dosaram os teores hormonais endógenos em gemas laterais de plantas de *Cicer arietinum* após a decapitação e também verificaram uma redução nas concentrações de ABA, confirmando sua atuação inibitória no desenvolvimento de gemas.

No entanto, ainda há muita controvérsia em relação à participação do ABA na dominância apical. Alguns trabalhos não encontraram diferenças marcantes nos teores de ABA em gemas laterais antes e após a decapitação (DÖRFFLING, 1976; WHITE & MANSFIELD, 1977; PILATE *et al.*, 1989), sugerindo que o ABA não possui um papel direto ou relevante na dominância apical. No presente trabalho, apenas nas primeiras 2 horas ocorreram diferenças mais marcantes nos teores endógenos de ABA entre os explantes C e SND, sendo que no restante do período analisado mantiveram-se praticamente constantes (figura 12). Em acordo com essa proposição, KNOX & WAREING (1984) analisaram o envolvimento do ABA na inibição das gemas laterais de plantas de feijoeiro, não sendo encontradas diferenças nos teores desse hormônio entre as gemas laterais de plantas decapitação. Somente após 24 horas da eliminação do ápice ocorreu uma diminuição no conteúdo de ABA nas gemas laterais.

Para os explantes de abacaxizeiro, foi possível verificar, ainda, que simultaneamente à redução dos níveis de ABA nos explantes de abacaxizeiro (figura 12), os teores endógenos de AIA mantiveram-se inferiores nos explantes SND (figura 10). KNOX & WAREING (1984) afirmaram que a interação entre AIA e ABA é decisiva para o desenvolvimento da gema lateral. Esses autores observaram que a aplicação de AIA na região decapitada da planta promoveu uma elevação dos teores de ABA nas gemas, inibindo seu desenvolvimento. TUCKER (1980) (*apud* CLINE, 1991) propõe que a auxina produzida no ápice se mova

basipetamente, estimulando a síntese de ABA na gema lateral ou próximo a ela, inibindo o seu crescimento. Esses resultados poderiam explicar o resultado obtido em abacaxizeiro que mostrou uma redução nos teores de ABA mais acentuada nos explantes SND nas primeiras 2 horas em relação aos explantes C, que possuíam o ápice intacto, fonte de AIA.

Em um estudo realizado por PEARCE *et al.* (1995) foram determinados os teores de AIA e ABA nas gemas axilares de *Elytrigia repensi* após decapitação do rizoma. Observou-se que o teor de ABA na gema axilar foi reduzido em 20% nas primeiras 12 horas a partir da decapitação. O crescimento da mesma só foi acentuado após 48 horas, sendo que após 6 horas da decapitação não houve redução do teor de AIA. Esses autores concluíram que a liberação das gemas da dominância apical nessa planta não requer redução de AIA, mas sim, uma redução no teor de ABA. O efeito dessa redução no desenvolvimento das gemas poderia ser indireto, isto é, como conseqüência da presença de AIA, resultando na redução da síntese de ABA nas gemas axilares.

A redução nos teores endógenos de ABA mais acentuada nas primeiras 2 horas nos explantes SND coincidiu com a menor razão AIA/CITs (figura 11; tabela 2) nesses explantes em relação ao controle. EMERY *et al.* (1998) sugeriram que o ABA atuaria como um inibidor no processo de crescimento de gemas laterais, a partir de observações de que sua redução coincidiu com a redução na razão AIA/CITs nas gemas laterais, o que promovia seu desenvolvimento.

No presente estudo, pode-se sugerir que a redução inicial nos teores de ABA mais acentuada nos explantes SND pode estar correlacionada com o aumento da expressão dos genes CycD2;1 e H2A, logo na 1^a hora após a decapitação (figura 20). Essa redução poderia atuar como um sinal indutor à retomada do ciclo celular na maioria das células do primórdio gemífero nesses explantes, levando ao desenvolvimento do primórdio de gema axilar em uma nova planta.

Sabe-se que o ABA diminui a atividade mitótica, atuando na expressão do gene ICK1, uma proteína inibidora de cinases dependentes de ciclinas (CDC). A ICK1 interage com a cinase CDC2a e com a ciclina CycD3, inibindo a atividade dessas proteínas, levando a parada do ciclo celular (WANG *et al.*, 1998). Em um interessante estudo, SWIATEK *et al.* (2002), trabalhando com a cultura de células de tabaco BY-2, verificaram que a aplicação de ABA na transição G1/S inibiu a replicação de DNA e portanto, a progressão do ciclo celular. Por outro lado, os autores também observaram que a aplicação de ABA durante a fase S não causava um efeito inibitório na progressão do ciclo celular.

Os resultados de incorporação de timidina triciada pelos segmentos nodais do abacaxizeiro indicaram uma menor incorporação desse marcador nos explantes C em relação aos explantes SND, principalmente a partir de 12 horas de cultivo (figura 21). Alguns trabalhos relataram o efeito do ABA na redução da atividade mitótica por meio de uma menor taxa de incorporação de timidina triciada, sugerindo inibir a síntese de DNA (HEMERLY *et al.*, 1993; ROBERTSON *et al.*, 1990; LEUNG *et al.*, 1994). Assim, pode-se considerar que os maiores teores de ABA, encontrados nos explantes C nas primeiras horas, sinalizou para uma interrupção do ciclo celular nesses explantes.

V.2 Açúcares

Os açúcares além de serem considerados nutrientes são sinalizadores da expressão de certos genes reguladores da divisão e da diferenciação celular, influenciando positivamente ambos os processos (JANG *et al.*, 1997).

No presente trabalho foi possível observar que, apesar de ter sido acrescentada sacarose ao meio de cultura no qual os explantes foram cultivados, os teores endógenos desse açúcar aumentaram progressivamente ao longo das 24 horas nos explantes SND. Nesses explantes o conteúdo de sacarose apresentou-se sempre maior em relação ao controle logo a partir da 1^a hora (figura 13). Esse dado poderia ser explicado pelo fato de que a decapitação proporcionou uma ativação de transportadores de sacarose nos explantes SND, contribuindo para a mobilização da sacarose às células competentes no primórdio de gema desses explantes, promovendo a retomada das divisões celulares após a eliminação do ápice.

BORISJUK *et al.* (2002), estudando o controle mediado por sacarose na diferenciação de cotilédones durante a embriogênese de *Vica faba*, verificaram um aumento de transportadores de sacarose em tecidos em alta proliferação celular.

Alguns trabalhos mostraram a regulação mediada por hormônios na ativação de transportadores de sacarose. HARMS *et al.* (1994) constataram que transportadores de sacarose são ativados por citocininas. Nos explantes de abacaxizeiro é possível que os maiores teores de citonininas encontrados nos explantes SND estejam associados com a ativação de transportadores de açúcares nas células do primórdio gemífero desses explantes.

Como comentado anteriormente, no presente trabalho, foi observado um aumento progressivo dos teores de sacarose a partir da 1^a hora após o isolamento do ápice nos explantes SND (figura 13). Nesses mesmos explantes, verificou-se que na 8^a hora ocorreu um pico de expressão de CycD2;1 e H2A (figura 20). Provavelmente, a sacarose tenha sinalizado

a indução da expressão desses genes, promovendo a retomada do ciclo celular nos explantes SND em G1/S. Segundo os dados de incorporação de timidina triciada a maioria das células do primórdio de gema estaria em G1, sendo que na 24^a hora a fase S já teria se iniciado (figura 21).

Muitos trabalhos têm mostrado que a expressão dos genes que codificam proteínas do tipo ciclinas é induzida por sacarose ou glicose, sendo que a disponibilidade de sacarose é importante na modulação da divisão celular em meristemas. ROITSCH & EHNEB (2000) discutem que a ativação do crescimento, modulado pelas divisões celulares, está correlacionada com o suprimento de carboidratos, sendo a partição de carboidratos entre tecidos-fonte e tecidos-dreno importante no crescimento e desenvolvimento das plantas.

Em um importante trabalho, SONI *et al.* (1995) observaram a influência positiva de sacarose na expressão do gene da ciclina CycD2. Esses autores mostraram que a expressão dessa ciclina é induzida após 4 horas da adição de sacarose na cultura de células sincronizadas de *A. thaliana*, no intervalo G1. Entretanto, HEMERLY *et al.* (1993) já havia verificado que não só ciclinas seriam reguladas por sacarose, mas também a cinase CDC2a. Na ausência de sacarose, a redução da cinase e de sua sub-unidade ciclina em G1 levam à parada do ciclo celular nessa etapa, sendo a sacarose complemento fundamental à progressão do ciclo celular.

Estudando também o papel da sacarose na indução da expressão da ciclina CycD2, RIOU-KHAMLICHI *et al.* (2000) verificaram que a disponibilidade de sacarose tem um papel na transição G1/S, induzindo a expressão de ciclinas do tipo D. Esses autores constataram que na cultura de células de *A. thaliana* ocorreu um aumento dos teores de RNAm do gene CycD2 após 30 min da adição de sacarose ao meio de cultura, evidenciando a indução por sacarose desse gene logo no início da retomada do ciclo celular em G1. Foi observado também o efeito da adição de sacarose no meio de cultura quando plantas de *A. thaliana* foram mantidas na sua ausência por 8 dias. Nesse caso, verificaram um aumento de 6 vezes na expressão de CycD2 nas primeiras 24 horas. Esses autores também estudaram a expressão da ciclina CycD3 e notaram que a expressão desse gene ocorreu após 4 horas da adição de sacarose, sendo induzida posteriormente no ciclo, isto é, no início da fase S. Foi sugerido que a sacarose atuaria como um indutor primário da divisão celular nas plantas, sendo que a indução de CycD2 seria uma resposta inicial mediada por sacarose no controle do ciclo celular no início de G1, e CycD3 seria logo em seguida, no início da fase S.

COCKCROFT *et al.* (2000) verificaram que um maior número de divisões celulares está relacionado ao aumento na expressão da ciclina CycD2 em plantas transgênicas de tabaco super-expressando o gene dessa ciclina em G1. Ainda confirmando essa idéia, RICHARD *et al.* (2002) também constataram a indução de CycD2;1 após a adição de sacarose no meio de cultura de células sincronizadas de *A. thaliana* após 30 min da adição, no início de G1.

Foi possível observar que nos explantes SND, os teores das hexoses glicose e frutose (figura 14) aumentaram na 4^a e na 20^a hora. Nesse explantes, poderiam atuar invertases de parede para a quebra da sacarose, levando à formação das hexoses que atuariam na promoção da retomada do ciclo celular nos primórdios de gema.

WEBER *et al.* (1996) ainda utilizando sementes de *Vicia faba*, observaram que a atividade de invertase de parede de células da testa proporcionou um aumento no conteúdo de hexoses, correlacionado com uma forte atividade mitótica nos cotilédones. À medida que os teores de hexoses diminuíram, ocorreu um acúmulo de sacarose coincidente com a redução das divisões celulares, quando foram iniciados os processos de diferenciação e armazenamento na semente.

Partindo do conhecimento de que a formação da semente envolve uma fase de divisão celular, seguida da diferenciação e maturação da semente, BORISJUK *et al.* (1998) mostraram a

atuação diferencial de açúcares em tecidos com mitose ativa. Esses autores utilizaram um método de mapeamento histográfico de alta resolução e verificaram uma correlação positiva entre a atividade mitótica e a distribuição específica de glicose no desenvolvimento cotiledonar em embriões de *Vicia faba*. Durante a diferenciação dos cotilédones, detectaram-se gradientes nos teores de glicose em função do tipo celular, verificando maiores teores de glicose em células meristemáticas (região abaxial) e nas células diferenciadas, com baixa taxa de divisão (região adaxial), foram observados conteúdos menores de glicose e um acúmulo de amido. Foi sugerido que a concentração de glicose nas células está relacionada com um gradiente de atividade mitótica durante o desenvolvimento cotiledonar, desempenhando funções morfogenéticas durante o seu desenvolvimento.

Foi possível verificar com os dados de relação hexoses/sacarose (tabela 3; figura 14) que ocorreu uma redução dessa relação nos explantes SND, verificado principalmente pelo aumento de sacarose. Pode-se sugerir que as células do primórdio gemífero atuem como um "dreno" de nutrientes na retomada das divisões celulares. Possivelmente, o balanço AIA/CITs verificado nos explantes SND (figura 11; tabela 2) tenha sinalizado a mobilização de sacarose das células adjacentes para as células competentes do primórdio de gema. Sabe-se que as citocininas atuam na mobilização de nutrientes, bem como na indução de invertases de parede.

EHNEB & ROITSCH (1997) concluíram que a atividade de invertase extracelular ou de parede celular é crucial no suprimento via apoplasto de carboidratos de tecidos-dreno e em proliferação celular, com elevados teores de citocininas. Esses autores isolaram uma invertase de parede em plantas de *Chenopodium rubrum*, verificando altos conteúdos de RNAm referente ao gene dessa enzima induzidos por adição de zeatina no meio de cultura de suspensão de células, coincidindo com maiores teores de proteína e de atividade de invertase extracelular. Além disso, verificou-se que, associado ao aumento induzido por citocininas da invertase extracelular, um aumento de RNAm de genes de transportadores de hexose, mediado por citocininas. O aumento tanto de invertase extracelular como de transportadores de hexose levou ao maior suprimento de carboidratos, reforçando o papel do controle da partição de carboidratos mediado por hormônios, como no estímulo da divisão celular por citocininas. Assim, maiores teores de invertase e transportadores são umas das mudanças necessárias para o estímulo das divisões celulares e crescimento mediados por citocininas, fornecendo carboidratos aos tecidos em alta proliferação celular, o que é reforçado pelo aumento de captação de sacarose em resposta à adição de citocininas.

Para os explantes SND de abacaxizeiro, foi observado um aumento de amido logo na 1^ª hora, que se manteve até a 3^ª hora. A partir desse momento, foi observada uma redução progressiva do amido até a 24^ª hora (figura 15). Assim, pode-se constatar que houve um acúmulo transitório de amido nos explantes SND nas primeiras 3 horas. Nesses explantes, a presença inicial de amido pode ser considerada com sendo resultante da sacarose absorvida do meio de cultura, mas que logo poderia ser mobilizado tanto para prover energia a partir da sua quebra em sacarose, quanto para sinalizar a retomada do ciclo celular.

USCIATI *et al.* (1972) mostraram a participação do amido como também tendo um papel na indução do processo de divisão celular. Esses autores observaram acúmulo de amido nas células de gemas axilares de plântulas de *Cicer arietinum* nas primeiras quatro horas após a quebra da dominância apical com aplicação de citocinina, diferindo das plantas controles que não possuíam esse carboidrato de reserva. Foi verificado um aumento no conteúdo de DNA de 40 % maior em relação ao controle após 9 horas na presença da citocinina, e de 50 % em 24 horas. Os autores sugeriram que o acúmulo de amido representaria um suprimento energético ao processo de divisão celular em tecidos com uma alta atividade meristemática.

Com relação aos conteúdos de amido nos explantes C do abacaxizeiro, verificou-se que, exceto na 1^a e na 24^a hora, os teores de amido apresentaram-se maiores do que nos explantes SND, sendo que até a 3^a hora foi observado um aumento progressivo de amido nos explantes C (figura 15). Com base em resultados prévios realizados com primórdios de gemas axilares do abacaxizeiro (SOUZA *et al.*, 2003), sabe-se que nos explantes C também ocorrem divisões celulares, mas em menor número, e que não há diferenciação de tecidos para a formação de uma nova planta, como ocorre nos explantes SND. Alguns trabalhos mostram que tecidos com menor taxa de divisão celular podem acumular amido, como verificado por BORISJUK *et al.* (1998).

V.3 Aminoácidos

No presente estudo foi possível observar que a asparagina apresentou os maiores teores endógenos em ambos os explantes em relação aos demais aminoácidos dosados, representando cerca de 97 % do total de aminoácidos (figura 16). A asparagina é considerada um importante aminoácido de transporte e de armazenamento nas plantas, sendo que o acúmulo desse aminoácido é derivado da translocação pelas raízes em resposta ao suprimento do íon amônio. Esse aminoácido é sintetizado a partir da glutamina e do aspartato, via asparagina sintetase (KAWACHI *et al.*, 2002). MADER *et al.* (2003) estudaram as mudanças metabólicas durante o desenvolvimento de gemas laterais de plantas de *Cicer arietinum* após a eliminação do ápice e também verificaram um aumento nos teores endógenos de aminoácidos, em particular com uma participação expressiva de asparagina.

Muitos esforços têm sido feitos para elucidar os mecanismos envolvidos na sinalização das plantas. Em um importante trabalho, JACKSON (1993) define que o sinal químico pode se manifestar como uma mensagem negativa ou positiva. Na mensagem negativa ocorre uma redução de compostos fisiologicamente ativos e na mensagem positiva ocorre um aumento dos compostos.

Nos explantes SND de abacaxizeiro, os teores dos aminoácidos aspartato, arginina + treonina, alanina e fenilalanina mantiveram-se menores em relação ao controle durante as primeiras 2 horas; durante as primeiras 4 horas para asparagina, glutamina + glicina, GABA e triptofano e nas primeiras 12 horas para glutamato, isoleucina e leucina (figura 18).

A redução observada nos teores dos aminoácidos dosados nas primeiras horas de cultivo, além de representar uma possível sinalização negativa para o futuro desenvolvimento do primórdio de gema axilar, pode representar também um efeito de injúria causada pelo isolamento do ápice nos explantes SND. Um recente trabalho mostra a importância de se considerar nas análises bioquímicas dos explantes vegetais cultivados *in vitro* o efeito dos danos causados no momento da explantação. FEHÉR *et al.* (2003) apontam que a resposta ao estresse depende do nível de estresse e do estado fisiológico das células. Se o nível de estresse exceder a tolerância celular, a célula morre. Entretanto, níveis toleráveis de estresse desencadeiam um estímulo no metabolismo celular e induzem mecanismos de adaptação. As adaptações incluem uma re-programação da expressão gênica, bem como mudanças na fisiologia e no metabolismo celular. O estado celular alterado, induzido pelo estresse, pode ser considerado como parte da sinalização do processo estudado, mediando uma re-organização celular e permitindo uma mudança no padrão de desenvolvimento.

Durante o manuseio das plantas cultivadas *in vitro* e, principalmente durante o processo de isolamento dos explantes, esses foram submetidos à injúria. Nos explantes SND essa injúria poderá ter sido ainda maior em relação aos explantes C, pois no momento da coleta foram feitas duas excisões - para isolar o segmento caulinar da planta-mãe e para isolar o ápice (figura 3). FEHÉR *et al.* (2003) afirmam que a injúria causada no material vegetal, *per*

131

se, faz parte do sinal indutor para o processo organogenético, já que é desencadeada uma série de modificações bioquímicas do tecido. Possivelmente, a redução nos teores endógenos de aminoácidos, observada nos explantes SND nas primeiras horas de cultivo, seja o resultado de uma resposta ao estresse causada pelo isolamento do explante da planta-mãe somado ao efeito da decapitação - ambos fazendo parte da sinalização para a retomada das divisões celulares e desenvolvimento de uma nova planta.

Entretanto, logo após a 1^a hora de cultivo os aminoácidos - asparagina, glutamina + glicina, aspartato, glutamato, arginina + treonina, histidina, lisina, GABA, leucina e triptofano - tiveram seus teores endógenos aumentados nos explantes SND. A partir de 12 horas verificou-se um aumento mais acentuado para o glutamato e alanina e menos pronunciado para prolina e GABA. Após 20 horas, também foi verificado um aumento, menos intenso, nos teores de metionina, isoleucina, fenilalanina e arginina + treonina (figura 18). Provavelmente, o nível de expressão aumentado de CycD2;1 e H2A em SND, como observado na 8^a hora, (figura 20) sofreu influência de uma possível sinalização positiva mediada pelo aumento nos teores endógenos desses aminoácidos. Além disso, o aumento nos teores endógenos dos aminoácidos pode estar associado à promoção da maioria das células no primórdio de gema axilar nos explantes SND à entrada na fase S, na 24^a hora.

Foi demonstrado que o receptor de glutamato também reconheceria as formas dos aminoácidos glicina e GABA (DAVENPORT, 2002; BOUCHÉ *et al.*, 2003). Baseando-se na idéia de sinalização de JACKSON (1993), pode-se sugerir que nos explantes SND o aumento verificado de aminoácidos represente uma sinalização positiva na indução do processo de retomada do ciclo celular pelas células competentes do primórdio gemífero. TURANO *et al.* (2002) apontaram para o papel do receptor de glutamato em *A. thaliana* (AtGLR3.2) na

regulação da divisão celular. Esses autores verificaram o acúmulo do receptor em tecidos florais com alta proliferação celular.

Outros trabalhos mostraram que há evidências de que a disponibilidade de nitrogênio regule a expressão de genes relacionados ao ciclo celular. GOULD *et al.* (1981) verificaram que a progressão da transição G1/S do ciclo celular foi controlada pela disponibilidade de nitrogênio em uma cultura de células em suspensão. Em um importante trabalho, SONI *et al.* (1995) relataram que na cultura de células em suspensão de *A. thaliana*, quando na ausência de nitrato, houve um acúmulo de células em G1, sendo que após 48 horas sem adição de nitrato houve uma redução de transcritos de RNAm da ciclina CycD3. Quando o nitrato foi adicionado, induziu um aumento dos teores de transcritos dessa ciclina, anteriormente ao pico observado de síntese de DNA.

CORUZZI & ZHOU (2001) relataram que o glutamato pode funcionar como uma molécula sinalizadora da regulação do crescimento e do desenvolvimento vegetal, de modo semelhante ao descrito em animais, já que o receptor de glutamato identificado nas plantas é semelhante ao encontrado nos animais. Esses autores apontam que o glutamato atua nas plantas como um sinalizador do "status" de nitrogênio na célula e, ao se ligar ao receptor, permite a entrada de cálcio nas células. O aumento observado nos níveis endógenos de glutamato nos explantes SND após 12 horas pode representar um sinal à retomada da divisão e diferenciação celular nesses explantes. Além disso, sabe-se que o glutamato, quando há disponibilidade de esqueleto carbônico, pode ser fonte de re-distribuição do nitrogênio para todas as outras formas de aminoácidos, processo mediado por aminotransferases (CORUZZI & BUSH, 2001).

Assim, pode-se supor que o aumento de aminoácidos verificado nos explantes SND, atue como uma sinalização ao processo de retomada do ciclo celular pela maioria das células

133

do primórdio de gema axilar durante o seu desenvolvimento, além de atuar como um fator nutricional importante à manutenção das divisões celulares.

VI. Conclusões

Retomada do ciclo celular no primórdio de gema axilar do abacaxizeiro

A importância acerca da regulação do ciclo celular no desenvolvimento das plantas tem recebido especial atenção no que se refere à regulação diferencial de genes participantes do ciclo celular em reposta a uma sinalização específica. Muitos estudos vêm sendo realizados atualmente para melhor compreender os sinais que controlam o desenvolvimento vegetal, descrevendo sua influência na expressão gênica.

O presente trabalho teve como objetivo conhecer e relacionar as variações de alguns fatores endógenos, como hormônios, açúcares e aminoácidos com a retomada do ciclo celular por células do primórdio de gema axilar presente em segmentos nodais decapitados (explantes SND) de abacaxizeiro, analisando, para tanto, a expressão de certos genes envolvidos com o processo de divisão celular e a incorporação de [H³]timidina nesses explantes.

A partir da análise dos resultados de incorporação de timidina triciada sugere-se que as células do primórdio de gema axilar nos explantes SND estariam em G1. Mais especificamente, pôde-se concluir que até 12 horas a maioria dessas células estava numa fase inicial da transição G1/S, após esse momento, considerou-se que estavam em um período mais adiantado da transição G1/S e com 24 horas a fase S já estaria acontecendo na maior parte das células do primórdio. Vale ressaltar que as células analisadas da região do primórdio gemífero dos explantes SND, após a maceração do tecido, incluíram células adjacentes que também se dividem, no entanto, não tomam a rota organogenética, portanto, não participam da formação de uma nova planta. Da mesma forma, no controle (explantes C), houve divisão celular, em menor número comparativamente, não ocorrendo o surgimento de uma nova planta. De modo diferente da maioria das pesquisas que utiliza cultura de células sincronizadas em suspensão para estudar a regulação do ciclo celular, neste trabalho

empregou-se um tecido e, portanto, uma mistura de células em diferentes fases do ciclo estava presente durante as análises.

Nos explantes C havia células em divisão possivelmente garantindo o crescimento do tecido do segmento nodal. No entanto, em SND, foi possível considerar que houve uma sinalização específica para que algumas células competentes do primórdio de gema axilar retomassem o ciclo celular, com subseqüente formação organogenética. Isso parece ter sido mediado por variações nas concentrações de hormônios, açúcares e aminoácidos, cujas sinalizações foram determinantes já na 1^a hora após a eliminação do ápice nos explantes SND.

Portanto, a sinalização para a retomada do ciclo celular, e posterior diferenciação ocorrida nos explantes SND, poderia ser caracterizada pela somatória de diferentes fatores, como pelo balanço hormonal AIA/CITs sempre menor nos explantes SND, pela redução mais acentuada nos teores de ABA nesse explantes nas primeiras 2 horas, bem como pelo aumento ocorrido a partir da 1^a hora dos teores de sacarose e pelas mudanças ocorridas no padrão de aminoácidos. Esses fatores regulariam a maior expressão genes CycD2;1 e H2A ocorrida principalmente na 1^a e 8^a hora, levando as células competentes do primórdio de gema axilar a retomarem o ciclo celular. Sabe-se que a ciclina CycD2;1 atua na transição G1/S do ciclo celular e as proteínas histonas, como a H2A, são indicadores específicos da fase S. Dessa forma, a maior incorporação de timidina triciada nos explantes SND na 24^a hora confirmou que a maioria das células do primórdio de gema axilar já estaria na fase S, portanto, progredindo no ciclo celular.

VII. Perspectivas

No presente trabalho caracterizaram-se padrões bioquímico e de expressão gênica distintos para os explantes SND que, provavelmente, estão relacionados com a indução das células competentes do primórdio de gema nesses explantes à divisão celular e posteriormente diferenciação em uma nova planta. Diferentemente dos explantes C, cujas divisões celulares, que ocorreriam em menor número, são necessárias à manutenção do crescimento do próprio explante.

FLEMING (2006), sob uma nova perspectiva, aborda a relação entre a coordenação da divisão celular, diferenciação e morfogênese no meristema apical caulinar (MAC). A proliferação e o crescimento celular estão intimamente relacionados com a diferenciação celular à medida que as células se distanciam do meristema para a formação de primórdios de órgãos. As células do meristema pluripotentes tornam-se assim, comprometidas a diferentes vias de diferenciação. Além disso, nas plantas, novas células são geradas a partir de divisões no meristema também para a manutenção do crescimento e do corpo da planta.

À medida que as células em divisão são direcionadas no meristema, inicia-se o processo de diferenciação, envolvendo a expressão ou silenciamento de genes específicos, como por exemplo, a repressão de genes da classe KNOX (CASTELLANO & SABLOWSKI, 2005). Esses, atuam no controle da manutenção da identidade das células do MAC. Os mecanismos para a regulação da expressão dos genes KNOX incluem a participação de hormônios, como auxinas e citocininas. A super-expressão de KNOX induz um aumento na biossíntese de citocininas, que por sua vez atuam na indução da expressão de genes de ciclinas. Com relação às auxinas, um aumento na concentração de AIA nas células do MAC, em função do transporte polar, leva à repressão de genes KNOX. Essa interação entre os reguladores do desenvolvimento e os genes da classe KNOX desencadeia um padrão de sinais

de desenvolvimento, aliando divisão e diferenciação celular (HAY *et al.*, 2004). Provavelmente, nos explantes SND, os teores aumentados de citocininas contribuiriam para a indução da expressão de genes relacionados à formação do MAC, como os genes pertencentes à classe KNOX, que por sua vez contribuiriam para a síntese continuada de citocininas nesses explantes. No caso dos explantes SND de abacaxizeiro, tornar-se-ia interessante o estudo da expressão de genes da classe KNOX nas células competentes do primórdio de gema axilar, já que o aumento observado de citocininas nesses explantes poderia induzir a expressão desses genes.

Seria também interessante realizar uma análise de citometria de fluxo, tendo em vista que o tecido do primórdio de gema axilar contém células em diferentes etapas do ciclo celular. A partir dessa análise seria possível determinar o conteúdo de DNA das células do primórdio gemífero, indicando a proporção de células em diferentes fases do ciclo celular. Para uma maior garantia desses resultados poder-se-ia realizar uma micro-dissecção do primórdio, isolando ao máximo as células competentes que responderiam aos sinais indutores da retomada do ciclo. Dessa forma, se evitaria a presença de células adjacentes, que apenas se dividem, mas que não estão envolvidas no futuro desenvolvimento de um novo órgão.

Muitos trabalhos também indicaram a possibilidade de estudar a expressão de genes em meristemas a partir da técnica de hibridação *in situ*. No caso dos explantes SND de abacaxizeiro, seria interessante utilizar uma sonda feita a partir da transcrição reversa do cDNA com um gene relacionado ao ciclo celular, marcada radioativamente ou com fluorescência. Seriam feitos cortes histológicos do tecido do primórdio de gema axilar, no qual se hibridaria a sonda contendo o gene de interesse diretamente no RNAm do tecido, procedendo-se à observação em microscópio óptico ou confocal. Além disso, poder-se-ia realizar a produção de plantas transgênicas que contivessem uma construção com o promotor de um gene relacionado ao ciclo celular associado a um gene-repórter, como o GFP ("Green Fluorescent Protein"). Da planta transformada, seriam obtidos os explantes C e SND, seguindo o método descrito no presente trabalho, coletados temporalmente, e feitos cortes histológicos para a observação em microscopia de fluorescência.

VIII. Resumo

A potencialidade dos tecidos vegetais em desenvolver in vitro gemas, raízes ou embriões somáticos a partir de divisões celulares, sugere que todas as células vegetais são totipotentes, podendo ser induzidas a originar uma nova planta sob condições ideais. Os processos de divisão e diferenciação celular são precisamente controlados durante o desenvolvimento vegetal, sendo iniciados por sinalizações específicas que desencadeiam as primeiras divisões celulares na formação de um determinado órgão, garantindo o desenvolvimento coordenado do organismo. Muitos trabalhos ressaltam a importância de fatores endógenos na regulação da divisão celular em processos morfogenéticos, indicando a participação de hormônios, acúcares e aminoácidos como possíveis moléculas sinalizadoras da retomada do ciclo celular. No entanto, faltam estudos nos quais esses fatores estejam simultaneamente caracterizados e associados ao processo de divisão celular em um tecido vegetal. O presente trabalho teve como objetivo conhecer as variações nos teores de alguns fatores endógenos, como hormônios, açúcares e aminoácidos, que estariam correlacionadas com retomada do ciclo celular nas células de primórdios de gemas axilares de plantas de Ananas comosus (L.) Merr cultivadas in vitro. Para tanto, foram cultivados, por um período de 24 horas, segmentos nodais contendo o primórdio de gema axilar (explantes SND) após a perda da dominância apical, bem como de explantes-controles (explantes C), cujo segmento nodal continha também o ápice. Analisaram-se os teores endógenos de AIA por meio da técnica de GC-MS-SIM, de ABA pelo método HPLC-ELISA e de várias citocininas, dentre elas iP, iPR, Z e ZR, por LC/MS-MS e por HPLC-ELISA. Além disso, foram dosados os acúcares solúveis - frutose, glicose e sacarose - e alguns aminoácidos livres - asparagina, glutamina, aspartato, glutamato, prolina, dentre outros – por meio do método que utiliza HPLC. Como parâmetro para confirmar a ocorrência de divisões celulares nos primórdios de gemas axilares foi estudado o padrão de expressão em RT-qPCR de dois genes relacionados com o ciclo celular: uma ciclina do tipo D (CycD2;1) e uma histona (H2A). Para determinar a fase de replicação do material genético (fase S), [H³]timidina foi fornecida aos segmentos nodais. Foi possível verificar padrões bioquímico e de expressão gênica distintos para os explantes SND em comparação ao explantes C que, provavelmente, estão relacionados com a indução das células competentes do primórdio de gema nesses explantes à retomada do ciclo celular e posteriormente à diferenciação em uma nova planta. Possivelmente, essa indução ocorreu pela somatória de variações ocorridas nos explantes SND, como pela menor concentração de AIA, pelo aumento dos teores de iP + iPR logo a partir da 1^{a} hora e pelo aumento de Z + ZR após 12 horas, pelo balanço hormonal AIA/CITs, sempre menor nesses explantes, pela redução mais acentuada nos teores de ABA nas primeiras 2 horas, pelo aumento ocorrido a partir da 1^a hora dos teores de sacarose, pela redução na 1^a hora da maioria dos aminoácidos dosados e por um aumento acentuado de glutamato a partir da 12^a hora. Esses alterações foram associadas à maior expressão dos genes CycD2;1 e H2A nos explantes SND principalmente na 1^a e na 8^a horas, levando às células competentes do primórdio de gema axilar à re-entrada no ciclo celular. A partir da análise dos resultados de incorporação de [H³]timidina sugere-se que até 12 horas a maioria das células do primórdio de gema axilar nos explantes SND estava numa fase inicial da transição G1/S, após esse momento, as células estavam em um período mais adiantado dessa transição e com 24 horas a fase S já estaria acontecendo na maior parte das células do primórdio de gema axilar.

IX. Abstract

The potentiality of plant tissues in the development of buds, roots or somatic embryos *in vitro* from cell divisions suggests that all plant cells are totipotents, and therefore can be induced to originate a new plant under optimal conditions. Cell division and differentiation processes are precisely controlled during the plant development, being initiated by specific signalling which will trigger the first cell divisions in the formation of an organ, ensuring the coordinate development of the organism. Several works underline the importance of endogenous factors in the controlling of cell division in morphogenetic processes, where hormones, sugars and aminoacids are possible signals in the re-entering of cell cycle. However, there is a lack of studies where these factors are simultaneously characterized and associated to the cell division process in plant tissues. The present work aimed to study the changes in the levels of certain endogenous factors, such as hormones, sugars and aminoacids, which would be correlated to the re-entering of the cell cycle in cells of axillary bud primordia of Ananas comosus (L.) Merr cultivated in vitro. Therefore, nodal segments containing axillary bud primordia, after the loss of apical dominance (SND explants), were cultivated during 24 hours, as well as control-explants (C explants) of nodal segments containing the apex. Endogenous levels of IAA by GC-MS-SIM technique, ABA by HPLC-ELISA and various cytokinins (among iP, iPR, Z and ZR) by LC/MS-MS and HPLC-ELISA were analyzed. Besides that, soluble sugars – fructose, glucose and sucrose – and some free aminoacids – asparagine, glutamine, aspartate, glutamate, proline, among others – were also analyzed by HPLC. As a parameter to confirm the occurrence of cell divisions in the axillary bud primordia it was studied the expression pattern in RT-qPCR of two genes related to the cell cycle: a cyclin D type (CycD2;1) and a histone (H2A). To determine the replication phase (S phase), [H³]thymidine was added to the nodal segments. It was possible to verify distinct biochemical and genetic expression patterns to the SND explants in comparison to the C explants, which are probably related to the induction of competent cells in the bud primordia of these explants due to the re-entering of the cell cycle and furthermore differentiation of a new plant. Possibly this induction is in response to the changes occurred in the SND explants, such as the lower levels of IAA, the increase of iP+iPR contents right after the 1st hour and Z+ZR levels after 12 hours, the hormone IAA/CKs ratio – generally lower in the explants, the higher reduction of ABA amounts in the first two hours, the elevated level of sucrose from the 1st hour on, the reduction of most of aminoacids contents in the 1st hour and a high increase of glutamate from the 12th hour on. These alterations were associated to the higher expression of CycD2;1 and H2A genes in the SND explants, especially in the 1st and 8th hours, leading the axillary bud primordia competent cells to re-enter the cell cycle. The analysis of [H³]thymidine incorporation suggests that until 12 hours most of axillary bud primordial cells in the SND explants were in the initial phase of the G1/S transition. Later on, the cells were in a more advanced period of this transition, and at 24 hours the S phase would be already starting in most of the axillary bud primordia cells.

X. Anexos
Anexo 1

Composição dos meios de cultura utilizados na obtenção de plantas de abacaxizerio cultivadas *in vitro*, bem como para a obtenção dos explantes (C e SND)*.

Meio de Murashige & Skoog (1962) - (MS)

Macronutrientes: NH₄NO₃ (16.5 g.L⁻¹), KNO₃ (19 g.L⁻¹), CaCl₂.2H₂O (4.4 g.L⁻¹), MgSO₄.7H₂O (3.7 g.L⁻¹), KH₂PO₄ (1.7 g.L⁻¹) *Micronutrientes:* MnSO₄.4H₂O (22.3 mg.L⁻¹), ZnSO₄.7H₂O (8.6 mg.L⁻¹), H₃BO₃ (6.2 mg.L⁻¹), KI (0.83 mg.L⁻¹), Na₂MoO₄.2H₂O (0.25 mg.L⁻¹), CuSO₄.5H₂O (0.025 mg.L⁻¹), CoCl₂.6H₂O (0.025 mg.L⁻¹)

Meio de Multiplicação (EMBRAPA / CNPMF, Laboratório de Cultura de Tecidos)

Macronutrientes de MS Micronutrientes de MS Inositol (100 mg.L⁻¹) Glicina (4 mg.L⁻¹) Ácido nicotínico (0.5 mg.L⁻¹) Piridoxina-HCl (0.5 mg.L⁻¹) Tiamina-HCL (0.1 mg.L⁻¹) BAP (0.5 mg.L⁻¹) ANA (0.5 mg.L⁻¹)

Aos meios de cultura foram adicionados 20 g.L⁻¹ de sacarose e 10 ml.L⁻¹ de solução F (composta por 27.81 mg.L⁻¹ de FeSO₄.7H₂O e por 37.31 mg.L⁻¹ de Na₂ EDTA).

O pH dos meios de cultura foi ajustado para 5.8 anteriormente à esterelização em autoclave por 15 min a 120 0 C e 1 atm de pressão.

*As concentrações se referem à massa do componente a cada litro de meio de cultura

Anexo 2

Ribossomal 18S

```
NNNT
```

gi |7595526 |gb | AF207006.1 | Restio tetraphyllus 18S ribosomal RNA gene, complete sequence

```
Length=1740
Score = 371 bits (187), Expect = 7e-100
Identities = 210/214 (98%), Gaps = 3/214 (1%)
Strand=Plus/Minus
```

Query	22	CAACTTAAACTATACGCTATTGGGAGCTGGAATTACCGCGGCTGCTGGCACCAGACTTGC	81
Sbjct	589	CAACTTAAA-TATACGCTATTGG-AGCTGGAATTACCGCGGCTGCTGGCACCAGACTTGC	532
Query	82	CCTCCAATGGATCCTCGNTTAAGGGATTTAGATTGTACTCATTCCAATTACCAGACCCGA	141
Sbjct	531	CCTCCAATGGATCCTCG-TTAAGGGATTTAGATTGTACTCATTCCAATTACCAGACCCGA	473
Query	142	AGGGCCCGGTATTGTTATTTGTCACTACCTCCCCGTGTCAGGATTGGGTAATTTGCG	201
Sbjct	472	AGGGCCCGGTATTGTTATTTATTGTCACTACCTCCCCGTGTCAGGATTGGGTAATTTGCG	413
Query	202	CGCCTGCTGCCTTCCTTNGATGTGGTAGCCGTTT 235	
Sbjct	412	CGCCTGCTGCCTTCCTTGGATGTGGTAGCCGTTT 379	

GAPDH

```
gi |73685766 |gb |DT336758.1 | JBW048F10.b_070.abi Pineapple week 1-4 nematode-
infected gall
cDNA library Ananas comosus cDNA clone JBW048F10 similar to
Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, mRNA sequence.
Length=781
Score = 71.9 bits (36), Expect = 9e-10
Identities = 70/76 (92%), Gaps = 4/76 (5%)
Strand=Plus/Plus
```

147	AATGACCACAGTGCACTCTATCTA	ACAGCCTACACAATAAGAACTGTTGATGGGCCATCTA	206
178	AATGACCACAGTGCACTCTAT-TA	ACAGC-TACACAA-AAGA-CTGTTGATGGTCCATCAA	233
207	GCAAGGACTGGAGAGG 222		
234	GCAAGGACTGGAGAGG 249		
	147 178 207 234	147 AATGACCACAGTGCACTCTATCTA	147 AATGACCACAGTGCACTCTATCTACAGCCTACACAATAAGAACTGTTGATGGGCCATCTA 111 111 111

Histona H2A

ANGCATGACCTTATGGTAAAGCGAATTACTCCCCGNCCACCATTCAGTTTGGCTATCCGNGGGGGACAGATGGAGC TCGACACCCTCATCAAGGTGCACCATCGACATGGGGGCGGTGTCATCCCCCACAAGTCCCTCATTATGG GAGNNTNTGTNTNTTGGGAGTNGTGTTNGTTNTTGTNGGNTTTNTAGNGCTCCNNTGTTTCNGTNTNTTTGTTT NNTCNGGNNTNGGNTGGGTTTTT

<u>gi|73689298|gb|DT339406.1|</u> JBW097D11.b_089.abi Pineapple week 5-10 nematode-infected gall

```
cDNA library Ananas comosus cDNA clone JBW097D11 similar to
Putative histone H2A, mRNA sequence.
Length=891
Score = 133 bits (67), Expect = 2e-27
Identities = 129/141 (91%), Gaps = 8/141 (5%)
Strand=Plus/Plus
        GACCTTATGGTAAAGCGAATTACTCCCCGNCCACCATTCAGTTTGGCTATCCGNGGGGGAC 63
Query 4
        Sbjct 408 GACCTTAAGGTGAAGCGAATTACTCCCCG-CCACC-TTCAGTT-GGCTATCCGCGGGGAC
                                                 464
Query 64
        Sbjct 465
       -GA-GGAGCTCGACACCCTCATCAAGG-GCACCATCGC--TGGGGGGCGGTGTCATCCCCC
                                                 519
Query 124 ACATCCACAAGTCCCTCATTA 144
```

```
Sbjct 520 ACATCCACAAGTCCCTCATTA 540
```

Ciclina CycD2;1

```
CCTGACGTCACATGACCCCGNTGNGCGTGACTNTTGATGGTGCTCTGGACTTCTTNAGNTGTGTGTGC
ATTGGACCCCGTCTGNTAAGACGAGACGCCATTGATTGA
gi|73685049|gb|DT336393.1| JBW043F10.b_070.abi Pineapple week 1-4
```

```
nematode-infected gall
cDNA library Ananas comosus cDNA clone JBW043F10 similar to
cyclin D2, mRNA sequence.
Length=899
Score = 61.9 bits (31), Expect = 2e-07
Identities = 49/53 (92%), Gaps = 3/53 (5%)
Strand=Plus/Minus
          GACCCACATAGTCCCCACGGTGGNCATGTGCTCGTGACTCCCTCTCAACAAGG
Ouery 9
                                                           61
          Sbict 137
          GACCCACATAGTCCCCACG--GGGCATGTGCTCG-GACTCCCTCTCAACAAGG
                                                           88
ਜ
AGAATCCTGACCCACATAGTCCCCCACGGTGGNCATGTGCTCGTGACTCCCTCTCAACAAGG
gi|73685049|gb|DT336393.1| JBW043F10.b_070.abi Pineapple week 1-4 nematode-
infected gall
cDNA library Ananas comosus cDNA clone JBW043F10 similar to
cyclin D2, mRNA sequence.
Length=899
Score = 65.9 bits (33), Expect = 1e-08
Identities = 60/66 (90%), Gaps = 4/66 (6%)
Strand=Plus/Minus
Query 8 GACCCACATAGTCCCCACGGTGGNCATGTGCTCGTGACTCCCTCTCAACAAGGNAGACCN 67
          Sbjet 137 GACCCACATAGTCCCCACG--GGGCATGTGCTCG-GACTCCCTCTCAACAAGG-AGACCC 82
          ACGCAT 73
Query 68
```

```
Sbjct 81 ACGCAT 76
```

Quantitation Report – CycD2;1

Experiment Information

Run Name	amostras e curva eficiência CycD2;1		
Run Start	18/01/2006 11:52:17 AM		
Run Finish	18/01/2006 1:13:58 PM		
Run On Software Version	Rotor-Gene 6.0.14		
Run Signature	The Run Signature is valid.		
Gain FAM/Sybr	10.		

Quantitaton Information

Threshold	0.100
Left Threshold	1.000
Standard Curve Imported	No
Standard Curve (1)	conc= 10^(-0.332*CT + 7.281)
Standard Curve (2)	CT = -3.013*log(conc) + 21.936
Reaction efficiency (*)	1.14741 (* = 10^(-1/m) - 1)
М	-3.01283
В	21.93612
R Value	0.99517
R^2 Value	0.99037
Start normalising from cycle	1
Noise Slope Correction	No
Reaction Efficiency Threshold	Disabled
Normalisation Method	Standard
Digital Filter	Light
No Template Control Threshold	10%
Sample Page	СусD

Cycle	Cycle Point
Hold @ 50°c, 2 min 0 secs	
Hold 2 @ 95°c, 2 min 0 secs	
Cycling (45 repeats)	Step 1 @ 95°c, hold 15 secs
	Step 2 @ 60°c, hold 30 secs, acquiring to Cycling A(FAM/Sybr)
Melt (72-95°c) , hold 45 secs on the 1st step, hold 5 secs on next steps, Melt A(FAM/Sybr)	



Raw Data For Cycling A.FAM/Sybr



26 24

-10^03



-10^02

Concentration

-10^01

% Var
15.0%
1.8%
12.9%
22.7%
17.7%
15.1%
20.7%

Melt Report – CycD2;1

Experiment Information

Run Name	amostras e curva eficiência CycD2;1		
Run Start	18/01/2006 11:52:17 AM		
Run Finish	18/01/2006 1:13:58 PM		

Run On Software Version	Rotor-Gene 6.0.14
Run Signature	The Run Signature is valid.
Gain FAM/Sybr	10.

Melt Information

Digital Filter	None
Sample Page	CycD2;1
Temp. Threshold	.1°c
Threshold	.1

Profile

Cycle	Cycle Point
Hold @ 50°c, 2 min 0 secs	
Hold 2 @ 95°c, 2 min 0 secs	
Cycling (45 repeats)	Step 1 @ 95°c, hold 15 secs
	Step 2 @ 60°c, hold 30 secs, acquiring to Cycling A(FAM/Sybr)
Melt (72-95°c) , hold 45 secs on the 1st step, hold 5 secs on next steps, Melt A(FAM/Sybr)	



No.	Colour	Name	Genotype	Peak 1	Peak 2	Peak 3	Peak 4
1		16h C		76.2	81.7	87.5	
2		16h SND		78.2	83	87.5	
3		0h		76.7	87.5		
4		1h C		78.3	87.3		
5		1h SND		77	87.5		
6		2h C		76.5	87.5		
7		2h SND		76.3	80.7	87.5	
8		3h C		75.8	78.3	83.5	87.5
9		3h SND		77.5	87.5		
10		4h C		75.7	81.7	87.5	93.2
11		4h SND		77	81	87.5	
12		8h C		76.8	87.5	92.7	
13		8h SND		75	78.7	87.5	
14		12h C		77	83.5	87.5	
15		12h SND		76.3	78.2	87.5	
16		20h C		79	87.5		
17		20h SND		77.5	83	87.3	
18		24h C		76.3	81.7	87.3	93.3
19		24h SND		74.8	78	81.5	87.3
22		MQ		78.3			
23		12h SND		77.7	83.3	87.3	
24		12h SND		76.8	87.2		
25		12h SND		77	83.3	87.3	
26		12h SND		78	87		
27		12h SND		76.8	87.2	91.7	
28		12h SND		77.7	87.2	91.5	
29		12h SND		78	87		
30		12h SND		76.5	87	91.7	

Quantitation Report – H2A

Experiment Information

Run Name	Amostras e curva eficiência H2A		
Run Start	26/01/2006 11:06:50 AM		
Run Finish	26/01/2006 12:26:29 PM		
Notes	teste com Hist, GAPDH, RIb 62oC		
Run On Software Version	Rotor-Gene 6.0.14		
Run Signature	The Run Signature is valid.		
Gain FAM/Sybr	10.		

Quantitaton Information

Threshold	0.100
Left Threshold	1.000
Standard Curve Imported	No
Standard Curve (1)	conc= 10^(-0.273*CT + 5.250)
Standard Curve (2)	CT = -3.665*log(conc) + 19.242
Reaction efficiency (*)	0.87433 (* = 10^(-1/m) - 1)
М	-3.66507
В	19.24238
R Value	0.99562
R^2 Value	0.99125
Start normalising from cycle	1
Noise Slope Correction	No
Reaction Efficiency Threshold	Disabled
Normalisation Method	Standard
Digital Filter	Light
No Template Control Threshold	10%

Cycle	Cycle Point
Hold @ 50°c, 2 min 0 secs	
Hold 2 @ 95°c, 2 min 0 secs	
Cycling (45 repeats)	Step 1 @ 95°c, hold 15 secs
	Step 2 @ 62°c, hold 30 secs, acquiring to Cycling A(FAM/Sybr)
Melt (72-95°c) , hold 45 secs on the 1st step, hold 5 secs on next steps, Melt A(FAM/Sybr)	



Raw Data For Cycling A.FAM/Sybr





No.	Colour	Name	Туре	Ct	Given Conc (Copies)	Calc Conc (Copies)	% Var
1		16h C	Unknown	21.70		.213566	
2		16h SND	Unknown	21.79		.202085	
3		0h	Unknown	22.99		.095131	
4		1h C	Unknown	21.99		.177578	
5		1h SND	Unknown	22.68		.115063	
6		MQ	NTC				
7		12h SND	Standard	22.64	.100000	.118249	18.2%
8		12h SND	Standard	22.74	.100000	.110847	10.8%
9		12h SND	Standard	22.95	.100000	.097415	2.6%
10		12h SND	Standard	26.43	.010000	.010953	9.5%
11		12h SND	Standard	26.92	.010000	.008061	19.4%
12		12h SND	Standard	27.15	.010000	.006946	30.5%
13		12h SND	Standard	30.26	.001000	.000983	1.7%
14		12h SND	Standard	30.19	.001000	.001033	3.3%
15		12h SND	Standard	29.87	.001000	.001257	25.7%
16		12h SND	Standard		.000100		
17		12h SND	Standard		.000100		
18		12h SND	Standard		.000100		

Melt Report – H2A

Experiment Information

Run Name	amostras e curva eficiência H2A
Run Start	26/01/2006 11:06:50 AM
Run Finish	26/01/2006 12:26:29 PM
Run On Software Version	Rotor-Gene 6.0.14
Run Signature	The Run Signature is valid.
Gain FAM/Sybr	10.

Melt Information

Digital Filter	None
Sample Page	Hist
Temp. Threshold	0°c
Threshold	0

Profile

Cycle	Cycle Point
Hold @ 50°c, 2 min 0 secs	
Hold 2 @ 95°c, 2 min 0 secs	
Cycling (45 repeats)	Step 1 @ 95°c, hold 15 secs
	Step 2 @ 62°c, hold 30 secs, acquiring to Cycling A(FAM/Sybr)
Melt (72-95°c) , hold 45 secs on the 1st step, hold 5 secs on next steps, Melt A(FAM/Sybr)	



No.	Colour	Name	Peak 1	Peak 2	Peak 3	Peak 4
1		16h C	75.5	80.5	89	
2		16h SND	75.2	80.2	89	
3		0h	78	89		
4		1h C	74.2	89		
5		1h SND	78.2	88.7		
6		MQ	78	83.7	87.8	93.5
7		12h SND	76.5	89		
8		12h SND	77.8	89		
9		12h SND	75.8	81.5	89	
10		12h SND	75.2	79.7	88.8	
11		12h SND	76	89		
12		12h SND	77.3	82.5	88.7	
13		12h SND	77.5	88.7		
14		12h SND	74.5	80.7	88.8	
15		12h SND	78	88.5		
16		12h SND	77.8	81.7	88.8	
17		12h SND	77.2	86.2	91	
18		12h SND	75.5	84.2		

Quantitation Report – Rib 18S

Experiment Information

Run Name	Amostras e curva eficiência Rib 18S
Run Start	17/01/2006 6:32:52 PM
Run Finish	17/01/2006 7:54:34 PM
Run On Software Version	Rotor-Gene 6.0.14
Run Signature	The Run Signature is valid.
Gain FAM/Sybr	10.

Quantitaton Information

Threshold	0.100
Left Threshold	1.000
Standard Curve Imported	No
Standard Curve (1)	conc= 10^(-0.293*CT + 2.131)
Standard Curve (2)	CT = -3.411*log(conc) + 7.269
Reaction efficiency (*)	0.96427 (* = 10^(-1/m) - 1)
Μ	-3.41062
В	7.26876
R Value	0.99957
R^2 Value	0.99914
Start normalising from cycle	1
Noise Slope Correction	No
Reaction Efficiency Threshold	Disabled
Normalisation Method	Standard
Digital Filter	Light
No Template Control Threshold	10%
Sample Page	RIB

Cycle	Cycle Point
Hold @ 50°c, 2 min 0 secs	
Hold 2 @ 95°c, 2 min 0 secs	
Cycling (45 repeats)	Step 1 @ 95°c, hold 15 secs
	Step 2 @ 60°c, hold 30 secs, acquiring to Cycling A(FAM/Sybr)
Melt (72-95°c) , hold 45 secs on the 1st step, hold 5 secs on next steps, Melt A(FAM/Sybr)	



Quantitation data for Cycling A.FAM/Sybr





No.	Colo	ur	Name	Туре	Ct	Given Conc (Copies)	Calc Conc (Copies)	% Var
1			16h C	Unknown	11.37		.062852	
2			16h SND	Unknown	10.33		.126249	
3			0h	Unknown	10.99		.081069	
4			1h C	Unknown	9.70		.194261	
5			1h SND	Unknown	11.03		.078814	
6			2h C	Unknown	10.61		.104993	
7			2h SND	Unknown	12.22		.035457	
9			3h SND	Unknown	11.52		.056765	
10			4h C	Unknown	12.68		.025969	
11			4h SND	Unknown	11.97		.041760	
12			8h C	Unknown	11.40		.061507	
13			8h SND	Unknown	12.48		.029675	
14			12h C	Unknown	10.49		.113634	
15			12h SND	Unknown	11.14		.073475	
16			20h C	Unknown	11.93		.042892	
17			20h SND	Unknown	10.73		.096329	
18			24h C	Unknown	12.07		.039232	
19			24h SND	Unknown	12.13		.037490	
21			MQ	NTC				
22			MQ	NTC	37.99		.000000	
23			12h SND	Standard	13.98	.010000	.010745	7.4%
24			12h SND	Standard	14.01	.010000	.010574	5.7%
25			12h SND	Standard	14.08	.010000	.010053	0.5%
26			12h SND	Standard	21.28	.000100	.000078	21.9%
27			12h SND	Standard	20.78	.000100	.000109	9.0%
28			12h SND	Standard	21.07	.000100	.000090	10.0%
29			12h SND	Standard	27.59	.000001	.000001	9.8%
30			12h SND	Standard	27.59	.000001	.000001	10.3%
31			12h SND	Standard	27.82	.000001	.000001	5.7%

Melt Report – Rib 18S

Experiment Information

Run Name	Amostras e curva eficiência Rib 18S
Run Start	17/01/2006 6:32:52 PM
Run Finish	17/01/2006 7:54:34 PM
Run On Software Version	Rotor-Gene 6.0.14
Run Signature	The Run Signature is valid.
Gain FAM/Sybr	10.

Melt Information

Digital Filter	None
Sample Page	RIB
Temp. Threshold	0°c
Threshold	.1

Profile

Cycle	Cycle Point
Hold @ 50°c, 2 min 0 secs	
Hold 2 @ 95°c, 2 min 0 secs	
Cycling (45 repeats)	Step 1 @ 95°c, hold 15 secs
	Step 2 @ 60°c, hold 30 secs, acquiring to Cycling A(FAM/Sybr)
Melt (72-95°c) , hold 45 secs on the 1st step, hold 5 secs on next steps, Melt A(FAM/Sybr)	



No.	Colour	Name	Genotype	Peak 1	Peak 2	Peak 3	Peak 4
1		16h C		74.2	78.8	85.7	
2		16h SND		75.5	77.5	85.8	90.7
3		0h		77.2	85.8		
4		1h C		75.5	86	90.8	
5		1h SND		75.3	81	86	90.8
6		2h C		78.5	85.8	90.5	
7		2h SND		76.7	81.7	85.8	90.8
9		3h SND		76.5	85.7	90.8	
10		4h C		75.5	85.7	91	
11		4h SND		77.2	85.8		
12		8h C		76	81.5	86	91.7
13		8h SND		74.3	78.2	85.8	
14		12h C		76.5	86	91	
15		12h SND		76.7	86	90.5	
16		20h C		80	86	90.8	
17		20h SND		75.5	85.7	91.2	
18		24h C		75.7	81.5	85.3	
19		24h SND		75.7	86	90.8	
21		MQ					
22		MQ		75.7	84	92	
23		12h SND		78.5	85.7		
24		12h SND		76	85.7	90.8	
25		12h SND		75.3	81.3	85.8	90.8
26		12h SND		77	85.7	90.5	
27		12h SND		76	85.7		
28		12h SND		75	81.7	85.7	92.7
29		12h SND		78.5	85.5		
30		12h SND		75.3	78.8	85.5	
31		12h SND		78.5	85.5		

Quantitation Report - GAPDH

Experiment Information

Run Name	Amostras e curva eficiência GAPDH
Run Start	25/01/2006 10:32:34 AM
Run Finish	25/01/2006 11:54:32 AM
Run On Software Version	Rotor-Gene 6.0.14
Run Signature	The Run Signature is valid.
Gain FAM/Sybr	10.

Quantitaton Information

Threshold	0.100
Left Threshold	1.000
Standard Curve Imported	No
Standard Curve (1)	conc= 10^(-0.296*CT + 3.827)
Standard Curve (2)	CT = -3.377*log(conc) + 12.923
Reaction efficiency (*)	0.97759 (* = 10^(-1/m) - 1)
М	-3.37683
В	12.92294
R Value	0.99868
R^2 Value	0.99737
Start normalising from cycle	1
Noise Slope Correction	No
Reaction Efficiency Threshold	Disabled
Normalisation Method	Standard
Digital Filter	Light
No Template Control Threshold	10%
Sample Page	GAPDH

Cycle	Cycle Point
Hold @ 50°c, 2 min 0 secs	
Hold 2 @ 95°c, 2 min 0 secs	
Cycling (45 repeats)	Step 1 @ 95°c, hold 15 secs
	Step 2 @ 60°c, hold 30 secs, acquiring to Cycling A(FAM/Sybr)
Melt (72-95°c) , hold 45 secs on the 1st step, hold 5 secs on next steps, Melt A(FAM/Sybr)	



Quantitation data for Cycling A.FAM/Sybr





No.	Colour	Name	Туре	Ct	Given Conc (Copies)	Calc Conc (Copies)	% Var
1		16h C	Unknown	15.30		0.1983	
2		16h SND	Unknown	15.05		0.2341	
3		0h	Unknown	17.27		0.0517	
4		1h C	Unknown	17.47		0.0450	
5		1h SND	Unknown	16.51		0.0869	
6		2h C	Unknown	17.91		0.0334	
7		2h SND	Unknown	16.54		0.0850	
8		3h C	Unknown	16.85		0.0688	
9		3h SND	Unknown	16.59		0.0818	
10		4h C	Unknown	16.94		0.0648	
11		4h SND	Unknown	16.54		0.0849	
12		8h C	Unknown	16.93		0.0649	
13		8h SND	Unknown	17.22		0.0533	
14		12h C	Unknown	16.31		0.0992	
15		12h SND	Unknown	16.43		0.0918	
16		20h C	Unknown	17.36		0.0485	
17		20h SND	Unknown	16.81		0.0705	
18		24h C	Unknown	16.52		0.0862	
19		24h SND	Unknown	17.50		0.0442	
22		MQ	NTC	38.59		0.0000	
24		12h SND	Standard	16.35	0.1000	0.0963	3.7%
25		12h SND	Standard	16.23	0.1000	0.1050	5.0%
26		12h SND	Standard	16.60	0.1000	0.0814	18.6%
27		12h SND	Standard	19.56	0.0100	0.0108	8.2%
28		12h SND	Standard	19.45	0.0100	0.0117	17.1%
29		12h SND	Standard	19.49	0.0100	0.0114	13.7%
30		12h SND	Standard	23.30	0.0010	0.0008	15.5%
31		12h SND	Standard	22.93	0.0010	0.0011	9.0%
32		12h SND	Standard	23.15	0.0010	0.0009	6.4%
34		12h SND	Standard	26.46	0.0001	0.0001	2.2%

Melt Report - GAPDH

Experiment Information

Run Name	Amostras e curva eficiência GAPDH
Run Start	25/01/2006 10:32:34 AM
Run Finish	25/01/2006 11:54:32 AM
Run On Software Version	Rotor-Gene 6.0.14
Run Signature	The Run Signature is valid.
Gain FAM/Sybr	10.

Melt Information

Digital Filter	None
Sample Page	GAPDH
Temp. Threshold	0°c
Threshold	.1

Profile

Cycle	Cycle Point
Hold @ 50°c, 2 min 0 secs	
Hold 2 @ 95°c, 2 min 0 secs	
Cycling (45 repeats)	Step 1 @ 95°c, hold 15 secs
	Step 2 @ 60°c, hold 30 secs, acquiring to Cycling A(FAM/Sybr)
Melt (72-95°c) , hold 45 secs on the 1st step, hold 5 secs on next steps, Melt A(FAM/Sybr)	



No.	Colour	Name	Genotype	Peak 1	Peak 2	Peak 3	Peak 4
1		16h C		75.5	85	89.8	
2		16h SND		80	85		
3		0h		76	85		
4		1h C		76.2	80	85	
5		1h SND		79.8	85		
6		2h C		76.5	84.8		
7		2h SND		74.8	77.5	84.8	
8		3h C		76	79.5	85	90.2
9		3h SND		76	84.8		
10		4h C		75.5	84.8	90	
11		4h SND		76.8	84.7	91	
12		8h C		75.7	85	90.2	91.2
13		8h SND		76	84.8	90.3	91.5
14		12h C		75	85	89.8	91.5
15		12h SND		77.2	85		
16		20h C		74.8	85	90	
17		20h SND		74	78.3	85	
18		24h C		77.8	85.2		
19		24h SND		76.2	85	89.8	
22		MQ		77			
23		12h SND					
24		12h SND		76.5	85		
25		12h SND		76	85		
26		12h SND		75.8	84.8		
27		12h SND		78.5	84.8		
28		12h SND		76.3	84.8		
29		12h SND		76	84.7	90	91.5
30		12h SND		78.2	84.7		
31		12h SND		75.5	84.7		
32		12h SND		77	84.5		
34		12h SND		76	84.5	90	

XI. Referências Bibliográficas

- AMARAL, L.I.V. (2005). Metabolismo de carboidratos estruturais e de reserva em cotilédones de Hymenaea courbaril (Jatobá). São Paulo, 123f. Tese (Doutorado em Botânica) – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo.
- AOYAMA, T.; OKA, A. (2003). Cytokinin signal transduction in plant cells. J. Plant Res., v. 116, p. 221-231.
- ASTOT, C.; DOLEZAL, K.; NORDSTROM, A.; WANG, Q.; KUNKEL, T.; MORITZ, T.; CHUA, N-H. (2000). An alternative cytokinin biosynthesis pathway. **Proc. Nat. Acad. Sci.**, v. 97, n. 26, p. 14778-14783.
- AUER, C.A. (2002). Discoveries and dilemas concerning cytokinin metabolism. J. Plant Growth Reg., v. 21, p. 24-31.
- BAKER, A.; HILL, G.F.; PARSONS, R. (1997). Alteration of N nutrition in *Mirica gale* induces changes in nodule growth, nodule activity and aminoacid composition. **Physiol. Plant.**, v. 99, p. 632-639.
- BALLA, J.; BLAZKOVÁ, J.; REINÖHL, V.; PROCHÁZKA, S. (2002). Involvement of auxin and cytokinins in initiation of growth of isolated pea buds. Plant Growth Reg., v. 38, p. 149-156.
- BANGERTH, F. (1994). Response of cytokinin concentration in the xylem exudate of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) plants to decapitation and auxin treatment, and relationship to apical dominance. **Planta**, v. 194, p. 439-442.
- BEECKMAN, T.; BURSSES, S.; INZÉ, D. (2001). The peri-cell-cycle in Arabidopsis. J. Exp. Bot., v. 52, p. 403-411.
- BIELESKI, R.L. (1964). The problem of halting enzyme action when extracting plant tissues. Anal. Biochem., v. 9, p. 431.
- BLAZKOVÁ, J.; KREKULE, J.; MACHÁCKOVÁ, I.; PROCHÁZKA, S. (1999). Auxin and cytokinins in the control of apical dominance in pea – a differential response due to bud position. J. Plant Physiol., v. 154, p. 691-696.
- BOER, B.G.W. DEN; MURRAY, J.A. (2000). Triggering the cell cycle in plants. Trends Cell Biol.,v. 10, p. 245-250.
- BORISJUK, L.; WALENTA, S.; ROOlletschek, H.; Mueller-Klieser, W.; Wobus, U.; Weber, H. (2002). Spatial analysis of plant metabolism: sucrose imaging within *Vicia faba* cotyledons reveals specific developmental patterns. **Plant J.**, v. 29, n. 4, p. 521-530.

- BORISJUK, L.; WALENTA, S.; WEBER, H.; MUELLER-KLIESER, W.; WOBUS, U. (1998). Highresolution histographical mapping of glicose concentrations in developing cotyledons of *Vicia faba* in relation to mitotic activity and storage processes: glicose as a possible developmental trigger. **Plant J.**, v. 15, n. 4, p. 583-591.
- BOUCHÉ, N.; LACOMBE, B.; FROMM, H. (2003). GABA signaling: a conserved and ubiquitous mechanism. **Trends Cell Biol.**, v. 13, n. 12, p. 607-610.
- BOWMAN, J.L.; ESHED, Y. (2000). Formation and maintenance of the shoot apical meristem. **Trends Plant Sci.**, v. 5, n. 3, p. 110-115.
- BREDMOSE, N.; KRISTIANSEN, K.; NORBAEK, R.; CHRISTENSEN, L.P.; HANSEN-MOLLER, J. (2005). Changes in concentrations in root and axillary bud tissue of miniature rose suggest that local Ck biosynthesis and zeatin-type Cks play impotant roles in axillary bud growth. J. Plant Regul., v. 24, p. 238-250.
- BRODY, R.J.; KERN, S.E. (2004). Sodium boric acid: a Tris-free, cooler conductive medium for DNA eletrophoresis. **Biotechn.**, v. 36, n. 2, p. 214-216.
- CABONI, E.; D'ANGELI, S.; CHIAPPETTA, A.; INNOCENTI, A.M.; VAN ONCKELEN, H.; DAMIANO,
 C. (2002). Adventicious shoot regeneration from vegetative shoot apices in pear and putative role of cytokinin accumulation in morphogenetic process. Plant Cell Tissue Organ Cult., v. 70, p. 199-206.
- CALLARD, D.; MAZZOLINI, L. (1997). Identification of proliferation-induced genes in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Physiol.**, v. 115, p. 1385-1395.
- CARLES, C.C.; FLETCHER, J.C. (2003). Shoot apical mersitem maintenance: the art of a dynamic balance. **Trends in Plant Sci.**, v. 8, n. 8, p. 394-400.
- CASIMIRO, I.; BEECKMAN, T.; GRAHAM, N.; BHALERAO, R.; ZHANG, H.M.; CASER, P.; SANDBERG, G.; BENNETT, M.J. (2003). Dissecting Arabidopsis lateral root development. **Trends Plant Sci.**, v. 8, p. 165-171.
- CASIMIRO, I.; MARCHANT, A.; BHALERAO, R.P.; BEECKMAN, T.; DHOOGE, S.; SWARUP, R.; GRAHAM, N.; INZÉ, D.; SANDBERG, G.; CASER, P.J.; BENNETT, M. (2001). Auxin transport promotes Arabidopsis lateral root initiation. **Plant Cell**, v. 13, p. 843-852.
- CASTELLANO, M.M.; SABLOWSKI, R. (2005). Intercellular signalling in the transition from stem cells to organogenesis in meristems. **Curr. Opin. Plant Biol.**, v. 8, p. 26-31.
- CHATFIELD, S.P.; STIRNBERG, P.; FORDE, B.G.; LEYSER, O. (2000). The hormonal regulation of axillary bud growth in *Arabidopsis*. **Plant J.**, v. 24, n. 2, p. 159-169.

- CHEN, J. (2001). Dual auxin signaling pathways control cell elongation and division. J. Plant Growth Reg., v. 20, p. 255-264.
- CHEN, J.G.; ZHAO, H.Y.; ZHOU, X.; MAO, L.S.; CHEN, X.X. (1997). Changes in levels of endogenous hormones in azalea released from apical dominance. J. Hortic. Sci., v. 72, n. 4, p. 583-591.
- CHEN, K.H.; MILLER, A. N.; PATTERSON, G.W.; COHEN, J.D. (1988). A rapid and simple procedure for purification of indole-3-acetic acid prior to GC-SIM-MS analysis. **Plant Physiol.**, v. 86, p. 822-825.
- CHRISTIANSON, M.L. (2000). ABA prevents the second cytokinin-mediated event during the induction of shoot buds in the moss *Funeraria hygrometrica*. **Am. J. Bot.**, v. 87, n. 10, p. 1540-1545.
- CLARK, S.E. (2001). Meristems: start your signaling. Curr. Opin. Plant Biol., v. 4, p. 28-32.
- CLEARY, A.L.; FOWKE, L.C.; WANG, H.; JOHN, P.C.L. (2002). The effect of ICK1, a plant cyclin-dependent kinase inhibitor, on mitosis in living plant cells. **Plant Cell Rep.**, v. 20, p. 814-820.
- CLINE, M.G. (1991). Apical dominance. Bot. Rev., v. 57, n. 4, p. 318-358.
- CLINE, M.G. (1994). The role of hormones in apical dominance. New approaches to an old problem in plant development. **Physiol. Plant.**, v. 90, p. 230-237.
- COCKCROFT, C.E.; BOER, B.G.W.; HEALY, J.M.S.; MURRAY, J.A.H. (2000). Cyclin D control of growth rate in plants. **Nature**, v. 405, p. 575-579.
- CORUZZI, G.M.; BUSH, D.R. (2001). Nitrogen and carbon: nutrient and metabolite signaling in plants. **Plant Physiol.**, v. 125, p. 61-64.
- CORUZZI, G.M.; LAST, R. (2000). Amino acids. *In*: BUCHANNAN, B.B.; GRUISSEM, W.; JONES, R.L. Biochemistry and molecular biology of plants. American Society of Plant Physiologists, Maryland. p. 358-410.
- CORUZZI, G.M.; ZHOU, L. (2001). Carbon and nitrogen sensing and sinaling in plant: emerging "matrix effects". **Curr. Opin. Plant Biol.**, v. 4, p. 247-253.
- D'AGOSTINO, I.B.; KIEBER, J. (1999). Molecular mechanisms of cytokinin action. Curr. Opin. Plant Biol., v. 2, p. 359-364.
- DAVENPORT, R. (2002). Glutamate receptors in plants. Ann. Bot., v. 90, p. 549-557.

- DE VEYLDER, L.; ALMEIDA, E.; BURSSENS, S.; MANEVSKY, A.; LESCURE, B.; VAN MONTAGU, M.; ENGLER, G.; INZÉ, D. (1999). A new D-type cyclin of *Arabidopsis thaliana* expressed during lateral root primordia formation. **Planta**, v. 208, p. 453-462.
- DE VEYLDER, L.; JOUBÈS, J.; INZÉ, D. (2003). Plant cell cycle transitions. Curr. Opin. Plant Biol., v. 6, p. 536-543.
- DEWITTE, W.; MURRAY, J.A.H. (2003). The plant cell cycle. Ann. Rev. Plant. Biol., v. 54, p. 235-264.
- DHARMASIRI, N.; DHARMASIRI, S.; ESTELLE, M. (2005). The F-box protein TIR1 is na auxin receptor. Nature, v. 435, p. 441-445.
- DOBREV, P.; MOTYKA, V.; GAUDINOVÁ, A.; MALBECK, J.; TRÁVNÍCKOVÁ, A.; KAMÍNEK, M.; VANKOVÁ, R. (2002). Transient accumulation of *cis*- and *trans*-zeatin and its relation to cytokinin oxidase activity during cell cycle of synchronized tobacco BY-2 cells. Plant. Physiol. Biochem., v. 40, p. 333-337.
- DOERNER, P. (2000). Cell division regulation. *In*: BUCHANAN, B.B.; GRUISSEM, W.; JONES,R.L. Biochemistry and molecular biology of plants. American Society of PlantPhysiologists, Maryland. p. 528-565.
- DOERNER, P. (2003). Plant meristems: a merry-go-round of signals. Curr. Biol., v. 13, p. R368-R374.
- DÖRFFFLING, K. (1976). Correlative bud inhibition and abscisic acid in *Acer pseudoplatanus* and *Syringa vulgaris*. **Physiol. Plant.**, v. 38, p. 319-322.
- DUBOIS, M.; GILLES, A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A.; SIMITH, F. (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Anal. Chem., v. 28, p. 350-355.
- EKLÖF, S.; ASTOT, C.; BLACKWELL, J.; MORITZ, T.; OLSSON, O.; SANDBERG, G. (1997). Auxincytokinin interactions in wild-type and transgenic tobacco. Plant Cell Physiol., v. 38, n. 3, p. 225-235.
- EMERY, R.J.N.; LONGNECKER, N.E.; ATKINS, C.A. (1998). Branch development in *Lupinus* angustifolium L. II. Relationship with endogenous ABA, IAA and cytokinin in axillary and main stem buds. J. Exp. Bot., v. 49, n. 320, p. 555-562.
- EHNEB, R.; ROITSCH, T. (1997). Co-ordinated induction of mRNA for extracellular invertase and glicose transporter in *Chenopodium rubrum* by cytokinins. **Plant J.**, v. 11, n. 3, p. 539-548.

- FEHÉR, A.; PASTERNAK, T.P.; DUDITS, D. (2003). Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. **Plant Cell Tissue Organ Cult.**, v. 74, p. 201-228.
- FINKELSTEIN, R.R.; GAMPALA, S.S.; ROCK, C.D. (2002). Abscisic acid signaling in seeds and seedling. **Plant Cell**, p. S15-S45.
- FLEMING, A.J. (2006). The co-ordination of cell division, differentiation and morphonesis in the shoot apical meristem: a perspective. **J. Exp. Bot.**, v. 57, n. 1, p. 25-32.
- FRANCIS, D.; SORRELL, D. A. (2001). The interface between the cell cycle and plant growth regulators: a mini review. **Plant Growth Reg.**, v. 33, p. 1-12.
- FUERST, R.A.U.A.; SONI, R.; MURRAY, J.A.H.; LINDSAY, K. (1996). Modulation of cyclin transcript levels in cultured cell of *Arabidopsis thaliana*. Plant Physiol., v. 112, p. 1023-1033.
- FULTON, T.M.; CHUNWONGSE, J.; TANKSLEY, S.D. (1995) Microprep protocol for Extraction of DNA from tomato and other herbaceous plants. Plant Mol. Biol. Rep., v. 13, n. 3, p. 207-209.
- GALOCH, E.; ZIELINSKA, M.; BURKACKA-LAUKAJTYS, E. (1998). The effect of decapitation on the levels of IAA and ABA in the lateral buds of *Betula pendula* Roth. Acta Physiol. Plant., v. 20, n. 4, p. 399-403.
- GAZZARRINI, S.; MCCOURT, P. (2003). Cross-talk in plant hormone signalling: what Arabidopsis mutants are telling us. **Ann. Bot.**, v. 91, p. 605-612.
- GENOUD, T.; MÉTRAUX, J. (1999). Crosstalk in plant: structure and function of the genetic network. Trends Plant Sci., v. 4, n. 12, p. 503-507.
- GIBSON, S.I. (2005). Control of plant development and gene expression by sugar signalling.Curr. Opin. Plant Biol., v. 8, p. 93-102.
- GOCAL, G.F.W.; PHARIS, R.P.; YEUNG, E.C.; PEARCE, D. (1991). Changes after decapitation of indole-3-acetic acid and abscisic acid in the larger axillary bud of *Phaseolus vulgaris* L. cv. Tender Green. **Plant Physiol.**, v. 95, p. 344-350.
- GOULD, A.R.; EVERETT, N.P.; WANG, T.L.; STREET, H.E. (1981). Studies on the control of the cell cycle in cultured plants. I. Effects on nutrient limitation and nutrient starvation.Protoplasma, v. 106, p. 1-13.
- GREFEN, C.; HARTER, K. (2004). Plant two-component systems: principles, functions, compexity and cross talk. **Planta**, v. 219, p. 733-742.

- GUITART, A.; HERMANDES, P.; CACHO, J. (1991). Stability of phenyl (thiocarbamoyl) aminoacids and optimization of their separation by high-performance liquid chromatografh. **Analyst.**, v.116, p. 399-403.
- HAMASAKI, R.M.; PURGATTO, E.; MERCIER, H. (2005). Glutamine enhaces competence for organogenesis in pineapple leaves cultivated *in vitro*. Braz. J. Plant Physiol., v. 17, n. 4, p. 383-389.
- HARMS, K.; WÖHNER, R.V.; SCHULZ, B.; FROMMER, W.B. (1994). Regulation of two p-type H⁺-ATPase genes from potato. **Plant Mol. Biol.**, v. 26, p. 979-988.
- HAY, A.; CRAFT, J.; TSIANTIS, M. (2004). Plant hormones and homeobox: bridging the gap. **BioEssays**, v. 26, p. 395-404.
- HEMERLY, A.S.; FERREIRA, P.C.G.; ENGLER, J.A.; VAN MONTAGU, M.; ENGLER, G.; INZÉ, D. (1993). Cdc2a expression in *Arabidopsis* is linked with competence for cell division. Plant Cell, v. 5, p. 1711-1723.
- HEMERLY, A S.; FERREIRA, P.C.G.; VAN MONTAGU, M.; INZÉ, D. (1999). Cell Cycle control and plant morphogenesis: is there an essential link? **BioEssays**, v.21, p.29-37.
- HELLMANN, H.; BARKER, L.; FUNCK, D.; FROMMER, W.B. (2000). The regulation of assimilate allocation and transport. Aust. J. Plant Physiol., v. 27, p. 583-594.
- HILLMAN, J.R.; MATH, V.B.; MEDLOW, G.C. (1977). Apical dominance and the levels of indole acetic acid in *Phaseolus* lateral buds. **Planta**, v. 134, p. 191-193.
- HINDLEY, J.; PHEAR, G.A. (1984). Sequence of cell division gene CDC2 from Schizosaccharomyces pombe: patterns of splicing and homology to protein kinases. Genes, v. 31, p. 129-134.
- HORTA, A.C.; SODEK, L. (1997). Free amino acids and storage protein composition of soybean fruit explants and isolated cotyledons cultured with and without methionine. **Ann. Bot.**, v.79, p.547-552.
- HORVATH, D.P.; ANDERSON, J.V.; CHAO, W.S.; FOLEY, M.E. (2003). Knowing when to grow: signals regulation bud dormency. **Trends Plant Sci.**, v. 8, n. 11, p. 534-540.
- HUH, G.H.; NAKAYAMA, T.; MESHI, T.; IWABUCHI, M. (1997). Structural characteristics of two wheat histone H2A genes encoding distinct types of variants and functional differences in their promoter activity. **Plant Mol. Biol.**, v. 33, p. 791-802.
- HWANG, I.; SAKAKIBARA, H. (2006). Cytokinin biosynthesis and perception. Physiol. Plant., v. 126, p. 528-538.

- INOUE, T.; HIGUCHI, M.; HASHIMOTO, Y.; SEKI, M.; KOBAYASHI, M.; KATO, T.; TABATA, S.; SHINOZAKI, K.; KAKIMOTO, T. (2001). Identification of CRE1 as a cytokinin receptor from *Arabidopsis*. Nature, v. 409, p. 4061-4064.
- JACKSON, B.M. (1993). Are plant hormones involved in root to shoot communication? Adv. Bot. Res., v. 19, p. 103-187.
- JANG, J.; LEÓN, P.; ZHOU, L.; SHEEN, J. (1997). Hexokinase as a sugar sensor in higher plants. Plant Cell, v. 9, p. 5-19.
- KAMÍNEK, M.; MOTYKA, V.; VANKOVÁ, R. (1997). Regulation of cytokinin content in plant cells. **Physiol. Plant.**, v. 101, p. 689-700.
- KAWACHI, T.; SUEYOSHI, K.; NAKAJIMA, A.; YAMAGATA, H.; SUGIMOTO, T.; OJI, Y. (2002).Expression of asparagine synthetase in rice (*Oryza sativa*) roots in response to nitrogen.Physiol. Plant., v. 114, p. 41-46.
- KEPINSKI, S. (2006). Integrating hormone signaling and patterning mechanisms in plant development. Curr. Opin. Plant Biol., v. 9, p. 28-34.
- KEPINSKI, S.; LEYSER, O. (2002). Ubiquitination and auxin signaling: a degrading story. **Plant Cell**, p. S81-S95.
- KEPINSKI, S.; LEYSER, O. (2005). The *Arabidopsis* F-box protein TIR1 is an auxin receptor. **Nature**, v. 435, p. 446-451.
- KNOX, J.P.; WAREING, P.F. (1984). Apical dominance in *Phaseolus vulgaris* L.: the possible roles of abscisic and indole-3-acetic acid. **J. Exp. Bot.**, v. 35, n. 151, p. 239-244.
- KOCH, K.E. (1996). Carbohydrate-modulated gene expression in plants. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol., v.47, p. 509-540.
- KOCH, K.E. (2004). Sucrose metabolism: regulatory mechanisms and pivotal roles in sugar sensing and plant development. **Curr. Opin. Plant Biol.**, v. 7, p. 235-246.
- KONING, A.J.; TANIMOTO, E.Y.; KIEHNE, K.; ROST, T.; COMAI, L. (1991). Cell-specific expression of plant histone H2A genes. **Plant Cell**, v. 3, p. 657-665.
- LALONDE, S.; BOLES, E.; HELLMANN, H.; BARKER, L.; PATRICK, J.W.; FROMMER, W.B.;
 WARD, J.M. (1999). The dual function of sugar carriers: transport and sugar sensing. Plant
 Cell, v. 11, p. 707-726.
- LAM, H-M.; CHIU, J.; HSIEH, M-H.; MEIESEL, L.; OLIVEIRA, I.C.; SHIN, M.; CORUZZI, G. (1998). Glutamate-receptor genes in plants. Nature, v. 396, p. 125-126.

- LAUREYS, F.; DEWITTE, W.; WITTERS, E.; MONTAGU, V. M.; INZÉ, D.; ONCKELEN, H. V. (1998). Zeatin is indispensable for the G2-M transition in tobacco BY-2 cells. **FEBS** Lett., v. 426, p. 29-32.
- LAUREYS, F.; SMETS, R.; LENJOU, M.; VAN BOCKSTAELE, D.; INZ'W, D.; VAN ONCKELEN, H. (1999). A low content in zeatin type cytokinin is not restrictive for the occurrence of G1/S transition in tobacco BY-2 cells. **FEBS Lett.**, v. 460, p. 123-128.
- LEON, P.; SHEE, J. (2003). Sugar and hormone connections. Trends Plant Sci., v. 8, n. 3, p. 110-116.
- LEUNG, J.; BOUVIER-DURAND, M.; MORRIS, P-C; GUERRIER, D.; CHEFDOR, F.; GIRAUDAT, J. (1994). Arabidopsis ABA response gene ABI1: features of a calcium-modulated protein phosphatase. Science, v. 246, p. 1448-1452.
- LI, C.-J.; BANGERTH, F. (1992). The possible role of cytokinin, ethylene and indoleacetic acid in apical dominance. In: KARSSEN, C.M.; VAN LOON, L.C.; VREUGDENHIL, D. Progress in Plant Growth Regulation, Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture. Kluwer Academic Publishers, Netherlands. p. 431-436.
- LIOTENBERG, S.; NORTH, H.; MARION-POLL, A. (1999). Molecular biology and regulation of abscisic acid biosynthesis in plants. **Plant Physiol. Biochem.**, v. 37, n. 5, p. 341-350.
- LJUNG, K.; HULL, A.K.; KOWALCZYK, M.; MARCHANT, A.; CELENZA, J.; COHEN, J.D.; SANDBERG, G. (2002). Biosynthesis, conjugation, catabolism and homeostasis of indole-3-acetic acid in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Mol. Biol.**, v. 50, p. 309-332.
- MADER, J. C.; ENERY, R.J.N.; TURNBULL, C.G.N. (2003). Spatial and temporal changes in multiple hormone groups during laterl bud release shortly following apex decapitation of chickpea (*Cicer arietinum*) seedlings. **Physiol. Plant.**, v. 119, p. 295-308.
- MADER, J.C.; HANKE, D.E. (1996). Immunocytochemical study of cell cycle control by cytokinin in culture soybean cells. J. Plant Growth Reg., v. 15, p. 95-102.
- MASUDA, Y. (1990). Auxin-induced cell elongation and cell wall changes. **Bot. Mag.**, v. 103, p. 345-370.
- MCCOURT, P.; LUMBA, S.; TSUCHIYA, Y.; GAZZARRINI, S. (2005). Crosstalk and abscisic acid: the roles of terpenoid hormones in coordinating development. **Physiol. Plant.**, v. 123, p. 147-152.
- MCCREADY, R.M.; GUGGOLZS, J.; SILVEIRA, V.; OWENS, H.S. (1950). Determination of starch and amylase in vegetables. Application to peas. **Analytical Chem.**, v. 22, p. 1156-1158.

- MEIJER, M.; MURRAY, J.A.H. (2001). Cell cycle controls and the development of plant form. **Curr. Opin. Plant Biol.**, v. 4, p. 44-49.
- MERCIER, H. (1993). Efeitos de fontes nitrogenadas sobre o desenvolvimento, teores hormonais endógenos, perfis polipeptídicos e isoenzimáticos em três espécies de bromélias cultivadas *in vitro*. São Paulo, 160 f. Tese (Doutorado em Botânica) Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo.
- MESHI, T.; TAOKA, K.; IWABUCHI, M. (2000). Regulation of histone gene expression during the cell cycle. **Plant Mol. Biol.**, v. 43, p. 643-657.
- MILLER, C.O.; SKOOG, F.S.; OKOMURA, M.H.; VON SALTZA, H.; STRONG, F.M. (1995). Kinetin, a cell division factor from deoxyribonucleic acid. J. Am. Chem. Soc., v. 77, p. 1392-1393.
- MIRONOV, V.; DE VEYLDER, L.; VAN MONTAGU, M.; INZÉ, D. (1999). Cyclin-dependent kinases and cell division in plants the nexus. **Plant Cell**, v. 11, p. 509-521.
- MOORE, S. & STEIN, W.H. (1954). A modified ninhydrin reagent for the photometric determination of amino acids and related compounds. J. Biol. Chem., v. 211, p. 907-913.
- MOYLE, R.L.; CROWE, M.L.; RIPI-KOIA, J.; FAIRBAIRN, D.J.; BOTELLA, J.R. (2005). A non line pineapple bioinformatics resourse. **Plant Biol.**, v. 5, n. 1, p. 21.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiol. Plant.**, v. 15, p. 473-497.
- NAMBARA, E.; MARION-POLL, A. (2005). Abscisic acid biosynthesis and catabolism. Annu. Rev. Plant. Biol., v. 56, p. 165-185.
- NETTING, A.G.; LIDGARD, R.O. (1999). Fragmentation of methyl abscisate and pentafluorobenzyl abscisate in methane electron capture negative tandem mass spectrometry. J. Mass Spectrom., v. 34, p. 611-621.
- NORDSTROM, A.; TARKOWSKI, P.; TARKOWSKA, D.; NORBAEK, R.; ASTOT, C.; DOLEZAL, K.; SANDBERG, G. (2004). Auxin regulation of cytokinin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana:* a factor of potencial importance for auxin-cytokinin-regulated development. **Proc. Nat. Acad. Sci.**, v. 101, n. 21, p. 8039-8044.
- OKUBO, H.; WADA, K.; UEMOTO, S. (1991). *In vitro* morphogenetic response and distribution of endogenous plant hormones in hypocotyl segments of snapdragon (*Antirrhinum majus* L.). Plant Cell Rep., v. 10, p. 501-504.

- OLIEV, R. (1994). Response to auxin by cells of *Riella helicophylla* during reversible arrest in different cell-cycle phases. **Planta**, v. 194, p. 510-515.
- PFAFFL, M.W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. Nucl. Acids Res., v. 29, n. 9, p. 2002-2007.
- PFAFFL, M.W.; TICHOPÁD, A.; PRGOMET, C.; NEUVIANS, T.P. (2004). Determination of satble housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper – Excel-based tool using pair-wise correlations. **Biotech. Letters**, v. 26, p. 509-515.
- PEARCE, D.W.; TAYLOR, J.S.; ROBERTSON, J.M.; HARKER, K.N.; DALY, E.J. (1995). Changes in abscisic acid and indole-3-acetic acid in axillary buds of *Elytrigia repens* released from apical dominance. **Physiol. Plant.**, v. 94, p. 110-116.
- PERES, L.E.P.; MERCIER, H.; KERBAUY, G.B.; ZAFFARI, G.R. (1997). Níveis endógenos de AIA, citocininas e ABA em uma orquídea acaule e uma bromélia sem raiz, determinados por HPLC e ELISA. **Rev. Bras. Fisiol. Veg.**, v. 9, p. 169-176.
- PILATE, G.; SOSSOUNTZOV, L.; MIGINIAC, E. (1989). Hormone levels and apical dominance in the aquatic fern *Marsilea drummondii* A. Br. **Plant Physiol.**, v. 90, p. 907-912.
- POLLOCK, C. G.; JONES, T. (1979). Seasonal patterns of fructan metabolism in forage grasses. New Phytologist, v. 83, p.8-15.
- POZO, J. C.; LOPEZ-MATAS, M.A.; RAMIREZ-PARRA, E.; GUTIERREZ, C. (2005). Hormonal control of the plant cell cycle. **Physiol. Plant.**, v. 123, p. 173-183.
- PRINSEN, E.; VAN DONGEN, W.; ESMANS, E.L.; VAN ONCKELEN, H. (1998). Micro and capillary liquid chromatography - tandem mass spectrometry: a new dimension in phytohormone research. J. Chromat., v. 826, p. 25-37.
- PURGATTO, E. (2001). Efeito do ácido indolil-3-acético no metabolismo amido-sacarose durante o amadurecimento de banana (*Musa* spp). 139 f. Tese de doutorado (Botânica) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- RANJEVA, R.; VIDAL, J. (2003). Regulation of metabolic networks as a conceptual frame to study plant signalling: a tribute to Pierre Gadal. Plant Physiol. Biochem., v. 41, p. 549-554.
- RAVEN, P.H.; EVERT, R.F.; EICHHORN, S.E. (2001). **Biologia Vegetal** 6. ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. 906 p.

- REDIG, P.; SHAUL, O.; INZÉ, D.; VAN MONTAGU, M.; VAN ONCKELEN, H. (1996). Levels of endogenous cytokinins, indole-3-acetic acid and abscisic acid during the cell cycle of synchronized tobacco BY-2 cells. FEBS Lett., v. 391, p. 175-180.
- REICHHELD, J.P.; GIGOT, C.; CHAUBET-GIGOT, N. (1998). Multilevel regulation of histone gene expression during the cell cycle in tobacco cells. Nucl. Ac. Res., v. 26, n. 13, p. 3255-3262.
- REICHHELD, J.P.; SONOBE, S.; CLÉMENT, B.; CHAUBET, N.; GIGOT, C. (1995). Cell cycleregulated histone gene expression in syncronized plant cells. **Plant J.**, v. 7, n. 2, p. 245-252.
- RICHARD, C.; LESCOT, M.; INZÉ, D.; DE VEYLDER, L. (2002). Effects of auxin, cytokinin, and sucrose on cell cycle gene expression in *Arabidopsis thaliana* cell suspension cultures. Plant Cell Organ Cult., v. 69, p. 167-176.
- RIOU-KHAMLICHI, C.; HUNTLEY, R.; JACQMARD, A.; MURRAY, J.A.H. (1999). Cytokinin activation of *Arabidopsis* cell division through a D-type cyclin. Science, v. 283, p. 1541-1544.
- RIOU-KHAMLICHI, C.; MENGES, M.; Healy, J.M.S.; Murray, J. A. H. (2000). Sugar control of the plant cell cycle: dfferential regulation of *Arabidopsis* D-type cyclin gene expression.
 Mol. Cel. Biol., v. 20, n. 13, p. 4513-4521.
- ROBERTESON, J.M.; HUBICK, K.T.; YEUNG, E.C.; REID, D.M. (1990). Developmental responses to drought and abscisic acid in sunflower roots. 2. Mitotic activit. **J. Exp. Bot.**, v. 41, p. 339-350.
- ROGGATAZ, U.; MCDONALD, A.J.S.; STADENBERG, I.; SHURR, U. (1999). Effects of nitrogen deprivation on cell division and expansion in leaves of *Ricinus communis* L. Plant Cell Envir., v. 22, p. 81-89.
- ROITSCH, T.; EHNEB, R. (2000). Regulation of source/sink by cytokinins. **Plant Growth Reg.**, v. 32, p. 359-367.
- ROLLAND, F.; MOORE, B.; SHEEN, J. (2002). Sugar sensing in plants. Plant Cell, p. S185-S205.
- ROUDIER, F.; FEDOROVA, E.; LEBRIS, M.; LECOMTE, P.; GYÖRGYEY, J.; VAUBERT, D.; HORVATH, G.; ABAD, P.; KONDOROSI, A.; KONDOROSI, E. (2003). The Medicago species A2-type cyclin is auxin regulated and involved in meristem formation but dispensable for

endoreplication-associated developmental programs. Plant Physiol., v. 131, p. 1091-1103.

- ROZEN, S.; SKALETSKY, H.J. (2000). Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: KRAWETZ, S.; MISENER, S. (eds) Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology. Humana Press, Totowa, NJ, p. 365-386.
- SAKAKIBARA, H. (2006). Cytokinins: activity, biosynthesis and translocation. Annu. Rev. Plant Biol., v. 13, p. 431-449.
- SHEEN, J.; ZHOU, L.; JANG, J. (1999). Sugars as signaling molecules. Curr. Opin. Plant Biol., v. 2, p. 410-418.
- SHIBAOKA, H. (1994). Plant hormone-induced changes in the orientation of cortical microtubules: alterations in the cross-linking between microtubules and the plasma membrane. Annu. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol., v. 45, p. 527-544.
- SKOOG, F.; MILLER, C.O. (1957). Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. Symp. Soc. Exp. Biol., v. 11, p. 118-231.
- SLOVIN, J.P.; BANDURSKI, R.S.; COHEN, J.D. (1999). Auxin. In: HOOYKAAS, P.J.J.; HALL,
 M.A.; LIBBENGA, K. R. (eds.). Biochemistry and Molecular Biology of Plant
 Hormones, chapter 5, Elsevier Science B.V. ed.
- SMEEKENS, S. (2000). Sugar-induced signal transduction in plants. Annu. Rev. Plant. Physiol. Mol. Biol., v. 51, p. 49-81.
- STITT, M.; MÜLLER, C.; MATT, P.; GIBON, Y.; CARILLO, P.; MORCUENDE, R.; SCHEIBLE, W-R.; KRAPP, A. (2002). Steps towards an integrated view of nitrogen metabolism. J. Exp. Bot., v. 53, n. 370, p. 959-970.
- SONI, R.; CARMICHAEL, J.P.; SHAH, Z.H.; MURRAY, J.A. (1995). A family of cyclin D homologs from plants differentially controlled by growth regulators and containing the conserved retinoblastoma protein interaction motif. **Plant Cell**, v. 7, p. 85-103.
- SOSSOUNTZOV, L.; MALDINEY, R.; SOTTA, B.; SABBAGH, I.; HABRICOT, Y.; BONNET, M.; MIGINIAC, E. (1988). Immunocytochemical localization of cytokinins in Craigella tomato and a sideshootless mutant. **Planta**, v. 175, p. 291-304.
- SOTTA, B.; PILLATE, G.; PELESE, F.; SABBAGH, I.; BONNET, M.; MALDINEY, R. (1987). An avidin-biotin solid phase ELISA for femtomole isopentenyladenine and isopentenyladenosine measurements in HPLC purified plant extracts. Plant Physiol., v. 84, p. 571-573.

- SOUZA, B.M., KRAUS, J.E.; ENDRES, L. MERCIER, H. (2003). Relantionships between endogenoous hormonal and axillary bud development of Ananas comosus nodal segments. **Plant Physiol. Bochem.**, v. 41, p.733-739.
- STALS, H.; INZÉ, D. (2001). When plant cell decide to divide? Trends in Plant Sci., v. 6, n. 8, p. 359-364.
- STANCATO, G.C.; MAZZAFERA, P.; BUCKERIDGE, M.S. (2001). Effect of drought period on the the mobilisation of non-structural carbohydrates photosynthetic efficiency and water status in epiphytic orchid. **Plant Physiol. Biochem**, v. 39, n. 11, p. 1009-1016.
- SUNDAS, A.; ENGSTROM, P. (1995). High level histone H2A expression during early stages of adventicious bud formation in Norway spruce (*Picea abies*). Physiol. Plant., v. 94, p. 197-204.
- SWIATEK, A.; LENJOU, M.; BOCKSTAELE, D.; INZÉ, D.; VAN ONCKELEN, H. (2002). Differential effect ofjasmonic acid and abscisic acid on cell cycle progression in tobacco BY-2 cells. Plant Physiol., v. 128, p. 201-211.
- TAMAS, I.A. (1995). Hormonal regulation of apical dominance. In: DAVIES, P.J. Plant
 Hormones Physiology, Biochemistry and Molecular Biology. Kluwer Academic
 Publishers, Netherlands. p. 572-597.
- TANAKA, M.; TAKEI, K.; KOJIMA, M.; SAKAKIBARA, H.; MORI, H. (2006). Auxin controls local cytokinin biosynthesis in the nodal stem in apical dominance. Plant J., v. 45, p. 1028-1036.
- THIMANN, K.V. (1937). On the nature of inhibitors caused by auxin. Am. J. Bot., v. 24, p. 407-412.
- THIMANN, K.V.; SKOOG, F. (1933). Studies on the growth hormone of plants. III. The inhibiting action of the growth substance on bud development. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, v. 19, p. 714-716.
- THIMANN, K.V.; SKOOG, F. (1934). On the inhibition of bud development and other functions of growth substance in *Vicia faba*. **Proc. Natl. Acad. Sci Biol. Sc.**, v. 114, p. 317-339.
- THOMAS, C.; MEYER, D.; WOLFF, M.; HIMBER, C.; ALIOUA, M.; STEINMETZ, A. (2003). Molecular characterization and spatial expression of the sunflower ABP1 gene. Plant Mol. Biol., v. 52, p. 1025-1036.
- TREWAVAS, A. (2000). Signal Perception and Transduction. *In*: BUCHANNAN, B.B.; GRUISSEM, W.; JONES, R.L. Biochemistry and molecular biology of plants. American Society of Plant Physiologists, Maryland. p. 930-987.
- TURANO, F.J.; MUHITCH, M.J.; FELKER, F.C.; MCMAHON, M.B. (2002). The putative glutamate receptor 3.2 from *Arabidopsis thaliana* (AtGLR3.2) is an integral membrane peptide that accumulates in rapidly growing tissues and persists in vascular-associated tissues. **Plant Sci.**, v. 163, p. 43-51.
- TURNBULL, C.G.N.; RAYMOND, M.A.A.; DODD, I.C.; MORRIS, S.E. (1997). Rapid increase in cytokinin concentration in lateral buds of chickpea (*Cicer arietinum* L.) during release of apical dominance. **Planta**, v. 202, p. 271-276.
- ULLAH, H.; CHEN, J.G.; YOUNG, J.C.; IM, K.; SUSSMAN, M.; JONES, A. (2001). Modulation of cell proliferation by heterotrimeric G protein in *Arabidopsis*. Science, v. 292, p. 2066-2069.
- USCIATI, M.; CODACCIONI, M.; GUERN, J. (1972). Early cytological and biochemical events induced by 6-benzylaminopurine application on axillary buds of *Cicer arietinum* plants. J. Exp. Bot., v. 23, n. 77, 1009-1020.
- VAN STADEN, J.; SPIEGELSTEIN, H.; ZIESLIN, N.; HALEVY, A.H. (1981). Endogenous cytokinin and lateral bud growth in roses. **Bot. Gaz.**, v. 142, n. 2, p. 177-182.
- VANKOVÁ, R. (1999). Cytokinin glycoconjugates distribuition, metabolism and function. Adv. Regul. Plant Growth Dev., p. 67-78.
- VANNESTE, S.; MAES, L.; DE SMET, I.; HIMANEN, K.; NAUDTS, M.; INZÉ, D.; BEECKMAN, T. (2005). Auxin regulation of cell cycle and its role during lateral root initiation. Physiol. Plant., v. 123, p. 139-146.
- VAN'T HOF, J. (1966). Experimental control of DNA synthetizing and dividing in excised root tips of Pisum. **Am. J. Bot.**, v. 53, n. 10, p. 970-976.
- VERKEST, A.; WEINL, C.; INZÉ, D.; DE VEYLDER, L.; SCHNITTGER, A. (2005). Switching the cell cycle. Kip-related proteins in plant cell cycle control. Plant Physiol., v. 139, p. 1099-1106.
- VOGLER, H.; KUHLEMEIER, C. (2003). Simple hormones but complex signalling. Curr. Opin. Plant Biol., v. 6, p. 51-56.
- WANG, H.; QI, Q.; SCHORR, P.; CUTLER, A.J.; CROSBY, W.L.; FOWKE, L.C. (1998). ICK1, a cyclin-dependent protein kinase inhibitor from *Arabidopsis thaliana* interacts with both

Cdc2a and CycD3, and its expression is induced by abscisic acid. **Plant J.**, v. 15, n. 4, p. 501-510.

- WANG, H.; ZHOU, Y.; GILMER, S.; WHITWILL, S.; FOWKE, L.C. (2000). Expression of the plant cyclin-dependent kinase inhibitor ICK1 affects cell division, plant growth and morphology. Plant J., v. 24, n. 5, p. 613-623.
- WANG, T.L.; WAREING, P.F. (1979). Cytokinin and apical dominance in *Solanum andigena*: lateral shoot growth and endogenous cytokinin levels in the absence of roots. **New Phytol.**, v. 82, p. 19-28.
- WEBER, H.; BORISJUK, L.; WOBUS, U. (1996). Controlling seed development and seed size in *Vicia faba*: a role for sedd coat-associated invertases and carbohydrate state. **Plant J.**, v. 10, n. 5, p. 823-834.
- WERNER, T.; MOTYKA, V.; LAUCOU, V.; SMETS, R.; VAN ONCKELEN, H.; SCHMÜLLING T. (2003). Cytokini-deficient transgenic Arabidopsis plants show multiple development alterations indicating opposite functions of cytokinin in the regulation of shoot and root mersitem activity. **Plant Cell**, v. 15, p. 2532-2550.
- WEYERS, J.D.B; PATERSON, W.N. (2001). Plant hormones and the control of physiological processes. **New Phytol.**, v. 152, p. 375-407.
- WHITE, J.C.; MANSFIELD, T.A. (1977). Correlative inhibition of lateral bud growth in *Pisum sativum* L. and *Phaseolus vulgaris* L.: studies of the role of abscisic acid. Ann. Bot., v. 41, p. 1163-1170.
- WILHLEM, J.; PINGOUD, A.; HAHN, M. (2003). Real-time PCR-based method for the estimation of genome sizes. **Nucl. Acids Res.**, v. 31, n. 10, p. 1-6.
- WILLIAMS, L.E.; LEMOINE, R.; SAUER, N. (2000). Sugar transporters in higher plants a diversity of roles and complex regulation. **Trends Plant Sci. Rev.**, v. 5, n. 7, p. 283-290.
- ZAZÍMALOVÁ, E.; BREZINOVÁ, A.; Holík, J.; Opatrny. (1996). Partial auxin deprivation affects endogenous cytokinins in an auxin-dependent, cytokinin-independent tobacco cell strain. Plant Cell Rep., v. 16, p. 76-79.
- ZAZÍMALOVÁ, E.; OPATRNÝ, Z.; BREZINOVÁ, A.; EDER, J. (1995). The effect of auxin starvation on the growth of auxin-dependent tobacco cell culture: dynamics of auxinbinding activity and endogenous free IAA content. J. Exp. Bot., v. 46, n. 290, p. 1205-1213.

- ZHANG, K.; LETHAM, D.S.; JOHN, P.C.L. (1996). Cytokinin controls the cell cycle at mitosis by stimulating the tyrosine dephosphorylation and activation of p34^{cdc2}-like H1 histone kinase. **Planta**, v. 200, p. 2-12.
- ZHANG, R.; ZHANG, X.; WANG, J.; LETHAM, D.S.; MCKINNEY, S.A.; HIGGINS, T.J.V. (1995). The effect of auxin on cytokinin levels and metabolism in transgenic tobacco tissue expressing an *ipt* gene. **Planta**, v. 196, p. 84-94.
- ZHANG, S.; LEMAUX, P.G. (2004). Molecular analysis of *in vitro* shoot organogenesis. Crit. Rev. Plant Sci., v. 23, n. 4, p. 325-335.
- ZHOU, L.; JANG, J.C.; JONES, T.L.; SHEEN, J. (1998). Glicose and ethylene signal transduction crosstalk revealed by an *Arabidopsis* glicose-insensitive mutant. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 95, p. 10294-10299.

Livros Grátis

(<u>http://www.livrosgratis.com.br</u>)

Milhares de Livros para Download:

Baixar livros de Administração Baixar livros de Agronomia Baixar livros de Arquitetura Baixar livros de Artes Baixar livros de Astronomia Baixar livros de Biologia Geral Baixar livros de Ciência da Computação Baixar livros de Ciência da Informação Baixar livros de Ciência Política Baixar livros de Ciências da Saúde Baixar livros de Comunicação Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE Baixar livros de Defesa civil Baixar livros de Direito Baixar livros de Direitos humanos Baixar livros de Economia Baixar livros de Economia Doméstica Baixar livros de Educação Baixar livros de Educação - Trânsito Baixar livros de Educação Física Baixar livros de Engenharia Aeroespacial Baixar livros de Farmácia Baixar livros de Filosofia Baixar livros de Física Baixar livros de Geociências Baixar livros de Geografia Baixar livros de História Baixar livros de Línguas

Baixar livros de Literatura Baixar livros de Literatura de Cordel Baixar livros de Literatura Infantil Baixar livros de Matemática Baixar livros de Medicina Baixar livros de Medicina Veterinária Baixar livros de Meio Ambiente Baixar livros de Meteorologia Baixar Monografias e TCC Baixar livros Multidisciplinar Baixar livros de Música Baixar livros de Psicologia Baixar livros de Química Baixar livros de Saúde Coletiva Baixar livros de Servico Social Baixar livros de Sociologia Baixar livros de Teologia Baixar livros de Trabalho Baixar livros de Turismo